

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**A ação protetora do selenito de sódio e da
selenometionina na toxicidade exercida por compostos
de mercúrio no sistema da tioredoxina das células de
neuroblastoma**

Inês Isabel Ribeiro Guerra

Dissertação

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2013

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**A ação protetora do selenito de sódio e da selenometionina
na toxicidade exercida por compostos de mercúrio no
sistema da tiorredoxina das células de neuroblastoma**

Inês Isabel Ribeiro Guerra

Dissertação orientada pela Prof.^a Doutora Cristina Maria Leitão de Carvalho,
Professora Associada da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos

2013

Agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer à Professora Doutora Cristina Maria Leitão de Carvalho, orientadora do presente trabalho, pelo apoio, paciência, disponibilidade e dedicação demonstrados ao longo de todo este processo. Sem a sua participação ativa, a conclusão do mesmo teria sido impossível. Para além disso, agradeço o facto de me ter proporcionado a oportunidade de trabalhar num projeto tão motivante e interessante.

Agradeço ainda à Professora Dora Brites, que gentilmente facultou as células SH-SY5Y que foram usadas no decurso desta dissertação bem como aos Professores Doutores João Gonçalves e Nuno Oliveira, que possibilitaram a utilização das salas de cultura de células.

Também gostaria de agradecer aos meus colegas na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa – Neusa Figueiredo, Daiane Meinerz, Andreia Rodrigues, Vanda Andrade, Edite Torres e Dinamene Santos – pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram. A boa disposição mas também a prontidão em ajudar são memórias que irei sempre guardar com carinho. Um obrigada especial ao Juan Rodrigues e ao Vasco Branco por todo o apoio que me deram nas mais variadas situações, desde o trabalho laboratorial até ao esclarecimento das dúvidas mais pequenas sempre com um sorriso, paciência, disponibilidade, dedicação e boa vontade intermináveis.

Obrigada à D. Helena Brito, D. Lurdes e D. Palmira pela simpatia com que sempre me trataram e por terem facilitado o meu processo de autonomia no laboratório.

Por último, mas não menos importante, quero deixar um enorme obrigada à minha Mãe e ao meu Pai pelo apoio incondicional e carinho que demonstraram durante todos os altos e baixos deste processo. Finalmente, um grande obrigada a todos os meus amigos e em especial à Maria Inês Timóteo que, embora nunca tenha percebido muito bem o meu trabalho, sempre me ouviu pacientemente, contribuindo para que me mantivesse motivada e bem-disposta. Sem eles não teria sido possível escrever estas linhas.

Há muitos mais a quem agradecer. A todos aqueles que, embora não mencionados, me concederam o seu inestimável apoio em distintos momentos, aqui fica o meu reconhecido e carinhoso agradecimento.

Este estudo foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) (www.fct.mctes.pt) através do projeto MERTOX (PTDC/QUI-BIQ/117281/2010) e do financiamento ao iMED.UL pelo projeto estratégico PEst-OE/SAU/UI4013/2011.

Resumo

O mercúrio (Hg) é um poluente global sem função biológica conhecida. A principal via de exposição dos humanos a este xenobiótico é através do consumo de peixe onde o mercúrio se encontra na forma de metilmercúrio (MeHg). De facto, o MeHg trata-se da forma de mercúrio mais perigosa para a saúde humana, o que advém de algumas das suas características toxicocinéticas tais como o facto de atravessar facilmente barreiras biológicas, distribuir-se por todo o corpo e ser lentamente eliminado do organismo. Todos estes fatores contribuem para a neurotoxicidade deste composto e para as preocupações relativamente aos efeitos que pode originar na saúde dos seres humano. Por sua vez, a exposição a compostos inorgânicos de mercúrio (Hg^{2+}) acontece principalmente em contextos ocupacionais onde exista vapor de mercúrio (Hg_v^0) ou pela libertação do último da superfície das amálgamas dentárias e sua subsequente oxidação a Hg^{2+} no organismo. A exposição aos compostos mercuriais pode afetar vários órgãos, sendo a gravidade e o tipo de efeitos dependente do tempo de exposição e da dose. Assim, tanto o MeHg como o Hg_v^0 conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica e causar efeitos neurotóxicos graves. No entanto, estes compostos podem ainda originar efeitos noutros órgãos como os rins, sistema cardiovascular e sistema imunitário. Os compostos mercuriais conseguem também atravessar a placenta e causar efeitos teratogénicos. O MeHg e o Hg^{2+} são compostos electrofílicos que têm a capacidade de se ligar aos grupos tiol (-SH) dos resíduos de cisteína (Cys) de péptidos e de enzimas. No entanto, os grupos selenol (-SeH) dos resíduos de selenocisteína (SeC) são ainda mais propensos a serem atacados por compostos electrofílicos e, por isso, as selenoenzimas são um alvo potencial dos compostos mercuriais. De facto, a interação entre selénio (Se) e mercúrio é um dos exemplos de antagonismo biológico melhor conhecidos e o efeito protetor do primeiro relativamente à toxicidade do último foi já observada em vários organismos. O sistema da tiorredoxina (Trx) é o principal responsável pela manutenção do estado redox das células e esta função envolve a redução de grupos tiol mediada por grupos selenol da tiorredoxina redutase (TrxR). Recentemente foi demonstrado *in vitro* com enzimas purificadas e em linhas celulares que o MeHg e o Hg^{2+} inibem a atividade das proteínas deste sistema, sendo que a enzima TrxR é particularmente suscetível a este tipo de inibição. Foi também demonstrado *in vitro* que a suplementação com selénio consegue reativar a TrxR inibida pelo mercúrio e recuperar a sua atividade.

Assim, no presente trabalho procurou-se avaliar os efeitos da co-exposição de compostos de selénio na interação entre os compostos mercuriais e o sistema da tiorredoxina. Para tal, foram realizados ensaios toxicológicos com uma linha celular de neuroblastoma

humano (células SH-SY5Y). Após a realização de ensaios de viabilidade com MTT, o MeHg revelou-se mais citotóxico para as células provocando uma redução no crescimento celular em cerca de 50% a uma concentração de 0,6 μM ao fim de 72 horas de exposição, por oposição aos 8,7 μM do Hg^{2+} . O selenito de sódio (Na_2SeO_3), selenato de sódio (Na_2SeO_4) e selenometionina (SeMet) não causaram uma redução em 50% no crescimento celular mesmo a concentrações de 100 μM e o mesmo foi observado quando as células foram tratadas com selenocistina (SeC-SeC) em concentrações até 50 μM . Também se observou que o MeHg se trata de um inibidor mais potente da atividade enzimática da TrxR em lisados celulares do que o Hg^{2+} (70 vs. 50% de inibição a 5 μM de MeHg e de Hg^{2+} , respetivamente). Como tal, estes resultados apontam para a existência de diferenças importantes entre o comportamento tóxico do MeHg e do Hg^{2+} em relação às células SH-SY5Y. Adicionalmente, os compostos de selénio demonstraram um efeito protetor significativo quando co-expostos com os compostos mercuriais, apesar de não terem sido capazes de evitar por completo a inibição da atividade enzimática da TrxR causada pelos últimos. Para além disso, o efeito benéfico da co-exposição ao Se verificou-se principalmente a concentrações mais baixas dos compostos mercuriais, sendo que a níveis mais elevados foi possível observar-se alguns efeitos pró-oxidantes associados a este micronutriente.

Palavras-chave: mercúrio; metilmercúrio; selénio; tiorredoxina; tiorredoxina redutase; selenoproteínas.

Abstract

Mercury (Hg) is a global contaminant without a known biological function. Methylmercury (MeHg) is the most dangerous form of mercury to human health and it is present in fish and seafood in variable amounts. Some features of MeHg toxicokinetics such as, its fast uptake across membranes, including the brain-blood barrier and the placenta, its distribution through the whole body and its slow elimination contribute to increased concerns about its effects on the human central nervous system (CNS). Its neurotoxic properties are of particular concern in infants and developing embryos. In its turn, exposure to inorganic compounds of Hg (Hg^{2+}) is primarily observed in occupational contexts where mercury vapour (Hg_v^0) might be involved and subsequently oxidized to Hg^{2+} in the organism. Mercurials bind to thiol (-SH) containing enzymes and proteins but selenols (-SeH) have a lower pKa than thiols and, under physiological conditions, are fully ionized to selenolates ($-\text{Se}^-$), making them more reactive and easily able to interact with Hg. In fact, the interaction between selenium (Se) and mercury is one of the best known examples of biological antagonism and the protective effect of the former against the latter's toxicity has been observed in a number of organisms. The thioredoxin system is the major system responsible for maintaining the redox state of cells and this function involves thiol reduction mediated by selenol groups in thioredoxin reductase (TrxR). In fact, it has been shown that Se supplementation can reactivate the mercury-inhibited TrxR and recover the enzyme activity *in vitro*.

In this work, the effects of mercurials and different Se compounds on the growth of human neuroblastoma SH-SY5Y cells were assessed by the MTT cell viability assay. MeHg was more toxic than Hg^{2+} , having a rather lower (> 15 fold) GI_{50} (0,6 vs. 8,7 μM) after 72 hours of exposure. Sodium selenite (Na_2SeO_3), sodium selenate (Na_2SeO_4) and selenomethionine (SeMet) did not cause a reduction in cell growth by 50% even at concentrations as high as 100 μM and the same was seen when cells were treated with selenocystine (SeC-SeC) in concentrations up to 50 μM . MeHg is also a stronger inhibitor of TrxR activity in cell lysates than Hg^{2+} (70 vs. 50% inhibition at 5 μM of MeHg and Hg^{2+} , respectively). Therefore, these results show important differences between the toxic behaviour of MeHg and Hg^{2+} in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Furthermore, the Se compounds showed a significant protective effect when co-exposed to mercurials although they were not able to fully prevent the inhibition of TrxR caused by the previous.

Keywords: mercury; methylmercury; selenium; thioredoxin; thioredoxin reductase; selenoproteins.

Lista de Abreviaturas

Acetil-CoA - acetilcoenzima A

ANA - anticorpos antinucleares (*antinuclear antibodies*)

ANoA - anticorpos antinucleolares (*antinucleolar antibodies*)

ASK1 - cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (*apoptosis signal-regulating kinase 1*)

BSA - albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

Cat - catalase

Cys - resíduo de cisteína

DHA - ácido docosahexaenóico 22:6

DMSO - dimetilsulfóxido

dNTPs - desoxirribonucleotídeos

DTNB - ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico) (reagente de Ellman)

DTT - (2S,3S)-1,4-bis-sulfanilbutano-2,3-diol (ditiotreitól)

EPA - ácido eicosapentaenóico 20:5

FAD - dinucleótido de flavina e adenina (*flavin adenine dinucleotide*)

FBS - soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

GI₅₀ - concentração do composto que inibe o crescimento celular em 50%

GLU - glutamato

Gly - resíduo de glicina

GPx - glutational peroxidase

GR - glutational redutase

GSH - glutational reduzida

GSSG - dissulfureto de glutational, também designado por glutational oxidada

Hg⁰ - mercúrio elementar

Hg²⁺ - ião mercúrico

Hg₂²⁺ - ião mercurioso

Hg_v⁰ - vapor de mercúrio

MeHg - metilmercúrio

Met - resíduo de metionina

MRL - nível de risco mínimo (*minimal risk level*)

mRNA - ácido ribonucleico mensageiro

MTT - brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

n-3 PUFAs - ácidos gordos polinsaturados n-3

NADPH - fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NMDA - receptores N-metil-D-aspartato

NTPs - ribonucleotídeos

p53 - proteína 53 de supressão tumoral

PBS - solução salina de tampão fosfato

PWTI - valor provisório da ingestão semanal tolerável (*provisional tolerable weekly intake*)

RfD - dose de referência (*reference dose*)

RNR - ribonucleotídeo redutase

ROS - espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species*)

SBP2 - proteína 2 de ligação à SECIS

Se⁻ - selenolato

Se⁰ - selênio elementar

Se²⁻ - seleneto

Se⁴⁺ - selenito

Se⁶⁺ - selenato

SeC - resíduo de selenocisteína

SECIS - sequência de inserção da selenocisteína (*selenocysteine insertion sequence*)

SeC-SeC - selenocistina

SecTRAPs - proteínas apoptóticas derivadas de TrxR com SeC alterada ou comprometida (*selenium compromised thioredoxin reductase - derived apoptotic proteins*)

SeH - grupo selenol

SelP - selenoproteína P

SeMet - selenometionina

SH - grupo tiol ou grupo sulfidrilo

SNC - sistema nervoso central

TGR - tiorredoxina glutationa redutase

THG - tapsigargina

TNB - ácido 2-nitro-5-mercaptop benzoico

tRNA - ácido ribonucleico de transferência

Trx - tiorredoxina

Trx1 - tiorredoxina citosólica

Trx2 - tiorredoxina mitocondrial

TrxR - tiorredoxina redutase

TrxR1 - tioredoxina redutase 1 (forma predominantemente citosólica)

TrxR2 - tioredoxina redutase 2 (forma predominantemente mitocondrial)

γ -GGT - γ -glutamilttransferase

Lista de Figuras

Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio (adaptado de Barkay and Wagner-Döbler, 2005).

Figura 2 – Liberação de mercúrio das amálgamas dentárias (adaptado de Clarkson et al., 2007).

Figura 3 – Metabolização do vapor de mercúrio inalado pela via da catalase e do peróxido de hidrogénio (Clarkson et al., 2007).

Figura 4 – Fórmula química do complexo formado pelo metilmercúrio com o aminoácido cisteína e do aminoácido metionina (adaptado de Clarkson et al., 2007).

Figura 5 – Relação entre *stress* oxidativo induzido pelo MeHg, níveis de Ca^{2+} e perda de homeostase pelo glutamato (adaptado de Farina et al., 2011).

Figura 6 – Estrutura química dos compostos inorgânicos e orgânicos de selénio: (1) selenito; (2) selenato; (3) selenocisteína; (4) selenometionina (adaptado de Suzuki and Ogra, 2001).

Figura 7 – O selenoproteoma humano. As selenoproteínas que apresentam o motivo -CXXU- (resíduos de Cys e de SeC separados por dois outros aminoácidos) são mostradas na caixa. *A Sep15 apresenta um motivo -CXU- (adaptado de Papp et al., 2007).

Figura 8 – Mecanismo proposto para a formação do complexo (Hg-Se)-SeIP na corrente sanguínea. O seleneto e os iões Hg^{2+} formam o complexo $(\text{Hg-Se})_n$ que, em seguida, se une seletivamente aos sítios de ligação (m) na SeIP para formar o complexo $[(\text{Hg-Se})_n]_m\text{-SeIP}$ (adaptado de Sasakura and Suzuki, 1998).

Figura 9 – Estrutura da Trx1 humana indicando a posição do centro ativo e dos três resíduos estruturais (Cys62, Cys69 e Cys73) (adaptado de Lillig and Holmgren, 2007).

Figura 10 – Modelo estrutural da TrxR de mamífero onde os pontos • nos domínios FAD representam o grupo dissulfureto/ditioi do terminal-N e os pontos • nos domínios da interface

representam o grupo selenilsulfureto/selenoltiol da elongação do terminal-COOH (adaptado de Zhong et al., 2000).

Figura 11 – Mecanismo proposto para a reativação da TrxR inibida pelo Hg^{2+} por ação do selenito de sódio (Carvalho et al., 2011).

Figura 12 – Fases da subcultura e proliferação celular (adaptado de Freshney, 2005b).

Figura 13 – Câmara de Neubauer (adaptado de Freshney, 2005c).

Figura 14 – Redução da molécula de MTT à forma de formazan graças à ação da enzima succinato desidrogenase mitocondrial.

Figura 15 – Toxicidade causada pelos compostos mercuriais no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de HgCl_2 (0; 1; 5; 10; 20; 50 μM) (A) e de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de 4 experiências independentes.

Figura 16 – Efeitos causados pelos compostos inorgânicos de selênio no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de Na_2SeO_3 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (A) e de Na_2SeO_4 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes.

Figura 17 – Efeitos causados pelos compostos orgânicos de selênio no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de SeMet (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (A) e de SeC-SeC (0; 5; 12,5; 25; 37,5; 50 μM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes.

Figura 18 – Efeito dos compostos mercuriais na atividade enzimática da TrxR em células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de HgCl_2 (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos

para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo. Os dados representam a média \pm erro padrão de 7 experiências independentes. *: significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,05); **: muito significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,01).

Figura 19 – Efeito dos compostos de selénio na atividade enzimática da TrxR em células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de Na_2SeO_3 (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) (A) ou de SeMet (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) (B) durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes. *: significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,05); **: muito significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,01).

Figura 20 – Efeito da co-exposição a Na_2SeO_3 na atividade enzimática da TrxR inibida pelos compostos mercuriais nas células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de $HgCl_2$ (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) e a 2,5 μM de Na_2SeO_3 durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade enzimática da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo (sem Na_2SeO_3). Os dados representam a média \pm erro padrão de 7 experiências independentes de tratamento celular com MeHgCl e $HgCl_2$ e a média \pm erro padrão de 4 experiências independentes de co-exposição de Na_2SeO_3 com os compostos mercuriais. •: significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,05); ••: muito significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,01).

Figura 21 – Efeito da co-exposição a SeMet na atividade enzimática da TrxR inibida pelos compostos mercuriais nas células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de $HgCl_2$ (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) e a 2,5 μM de SeMet durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo (sem SeMet). Os dados

representam a média \pm erro padrão de 7 experiências independentes de tratamento celular com MeHgCl e HgCl₂ e a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes de co-exposição de SeMet com os compostos mercuriais. •: significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,05); ••: muito significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,01).

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Recomendação de valores de ingestão de mercúrio seguros para a população humana por diferentes agências reguladoras internacionais.

Tabela 2 – Níveis de mercúrio detetados em algumas espécies de peixes capturados em águas portuguesas (adaptado de ASAE, 2009).

Tabela 3 – Valores de GI_{50} refletindo os efeitos dos compostos mercuriais na viabilidade das células SH-SY5Y em diferentes tempos de exposição medidos pelo ensaio do MTT.

Índice

| | |
|--|------|
| Agradecimentos | i |
| Resumo | ii |
| Abstract | iv |
| Lista de Abreviaturas | vi |
| Lista de Figuras | ix |
| Lista de Tabelas | xiii |
| Capítulo 1 – Introdução geral | 1 |
| 1. Introdução ao estudo do mercúrio | 1 |
| 1.1. Nota histórica | 1 |
| 1.2. Propriedades físicas e químicas do mercúrio | 2 |
| 1.3. Ciclo biogeoquímico do mercúrio | 3 |
| 1.4. Mercúrio elementar | 5 |
| 1.4.1. Fontes de exposição | 5 |
| 1.4.2. Toxicocinética | 6 |
| 1.5. Metilmercúrio | 8 |
| 1.5.1. Fontes de exposição | 8 |
| 1.5.2. Toxicocinética | 12 |
| 1.6. Efeitos tóxicos | 13 |
| 1.6.1. Exposição aguda | 13 |
| 1.6.2. Exposição crónica | 14 |
| 1.6.2.1. Neurotoxicidade | 14 |
| 1.6.2.2. Imunotoxicidade | 17 |
| 1.6.2.3. Cardiotoxicidade | 18 |
| 1.6.2.4. Nefrotoxicidade | 20 |
| 1.6.2.5. Teratogenicidade | 20 |
| 1.6.2.6. Carcinogenicidade | 21 |
| 2. Introdução ao estudo do selénio | 23 |
| 2.1. Importância biológica do selénio | 23 |
| 2.2. Interação mercúrio - selénio | 27 |
| 3. Introdução ao estudo do sistema da tiorredoxina | 31 |
| 3.1. Tiorredoxina (Trx) | 32 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Tiorredoxina redutase (TrxR) | 34 |
| 3.3. Funções biológicas do sistema da tiorredoxina | 36 |
| 3.4. Interação entre o sistema da tiorredoxina e compostos electrofílicos | 38 |
| 4. Objetivos | 41 |
| Capítulo 2 – Materiais e Métodos | 42 |
| 1. Equipamentos gerais | 42 |
| 2. Cultura celular | 42 |
| 2.1. Condições de cultura | 42 |
| 2.2. Contagem celular | 44 |
| 2.3. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) | 45 |
| 2.3.1. Reagentes | 45 |
| 2.3.2. Soluções | 45 |
| 2.3.3. Procedimento experimental | 45 |
| 2.4. Preparação de lisados celulares | 47 |
| 2.4.1. Reagentes | 47 |
| 2.4.2. Soluções | 47 |
| 2.4.3. Procedimento experimental | 47 |
| 3. Determinação de atividades enzimáticas | 48 |
| 3.1. Quantificação proteica | 48 |
| 3.2. Determinação da atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR) | 48 |
| 3.2.1. Reagentes | 48 |
| 3.2.2. Soluções | 48 |
| 3.2.3. Procedimento experimental | 49 |
| 4. Análise estatística | 50 |
| Capítulo 3 – Resultados e Discussão | 51 |
| 1. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade) | 51 |
| 2. Ensaio de determinação da atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR) | 56 |
| 2.1. Efeito da exposição a compostos mercuriais na atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR) | 56 |
| 2.2. Efeito da exposição a compostos de selénio na atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR) | 58 |
| 2.3. Efeito da co-exposição a compostos mercuriais e de selénio na atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR) | 61 |
| Capítulo 4 – Conclusões gerais e perspectivas futuras | 67 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 1. Conclusões gerais | 67 |
| 2. Perspetivas futuras..... | 69 |
| Referências..... | 71 |

Capítulo 1 – Introdução geral

1. Introdução ao estudo do mercúrio

1.1. Nota histórica

O mercúrio (Hg, do latim *hydrargyrum*), assim como alguns dos seus compostos, são conhecidos e utilizados desde os tempos remotos. Consequentemente, o contacto dos seres humanos com este elemento tem sido abundante pois os compostos mercuriais foram usados ao longo dos séculos como medicamentos em Medicina Humana e fungicidas na agricultura, bem como nas indústrias mineiras, de produção de termómetros e de produção de cloro (Clarkson et al., 2003a; Clarkson et al., 2007; Clarkson and Magos, 2006; Fitzgerald and Lamborg, 2004).

O primeiro registo de utilização do mercúrio está datado de 1600 - 1500 anos A.C., estando presente nos túmulos da 8ª e 9ª dinastia do Antigo Egipto. No entanto, o seu uso medicinal parecia ser evitado neste período. Provavelmente através do contacto com a cultura egípcia, na Grécia e Roma Clássicas o uso médico do mercúrio era também evitado e a sua utilização estava reservada a trabalhos artísticos ou a outros tipos de indústrias. Pelo contrário, na Ásia, a relação com este metal era bastante diferente uma vez que os médicos originários deste continente terão sido os impulsionadores do uso do mercúrio enquanto agente terapêutico. No entanto, inicialmente, o seu uso era apenas externo através de massagens para tratar vários problemas na pele, como pediculose, impetigo, manifestações pustulares e lepra (Abramowitz, 1934). De facto, os Árabes reconheceram a sintomatologia da intoxicação por Hg e conseguiram progredir mais na utilização deste metal do que os Europeus na Idade Média (Neal, 1938). O mercúrio na forma líquida era popular entre os alquimistas pois permitia dissolver metais preciosos como o ouro ou a prata que eram reobtidos na sua forma pura aquando da evaporação do Hg. Esta propriedade do mercúrio líquido continua a ser explorada até aos nossos dias na extração mineira (Clarkson et al., 2007). A primeira intoxicação ocupacional de grande escala causada pelo Hg terá ocorrido no Japão no século VIII aquando da construção de uma estátua em honra a Buda (Satoh, 2000). A aplicação terapêutica do mercúrio no tratamento da sífilis foi iniciada consideravelmente antes desta doença se ter espalhado pela Europa, o que se veio a concretizar no fim do século XV graças aos marinheiros vindos do 'Novo Mundo' (Abramowitz, 1934; Clarkson et al., 2007). O famoso médico Paracelsus observou que doses altas de Hg envenenavam os seus pacientes tendo

então pronunciado que a ‘a dose faz o veneno’ que, ainda hoje, se trata do principal pilar da Toxicologia (Clarkson, et al., 2007). De facto, o tratamento da sífilis com mercúrio acarretava vários efeitos nefastos para os pacientes, tais como a infeção e ulceração da garganta, boca e língua, edema da língua, dentes frágeis, salivação constante, tremores e até demência. Tendo em conta que na maioria dos casos se observavam recaídas, este tipo de terapia no tratamento da sífilis foi abandonada ao longo do século XIX e início do século XX (Clarkson and Magos, 2006). Apesar disso, nesta época, vários compostos mercuriais continuaram a estar presentes nalgumas farmacopeias mundiais (Wheeler, 1947), sendo usados no tratamento de uma grande variedade de patologias (Chisholme, 1813; Clarke, 1912; Kollok, 1896).

Atualmente, a população mundial encontra-se principalmente exposta a três formas de Hg: vapor de mercúrio (Hg_v^0), libertado pelas amálgamas dentárias, metilmercúrio (MeHg), naturalmente bioacumulado no peixe, e um composto de etilmercúrio chamado Timerosal que é incluído nas vacinas nas quais exerce uma ação conservante (Clarkson et al., 2003a). Tendo em consideração que o MeHg é uma das formas mais tóxicas de Hg e que o vapor de mercúrio é oxidado nas células à forma do ião mercúrico (Hg^{2+}), sendo este o responsável direto pelas interações tóxicas (Clarkson, 2002), o presente trabalho irá focar-se na toxicologia do MeHg e do Hg^{2+} .

1.2. Propriedades físicas e químicas do mercúrio

O mercúrio pertence ao Grupo 12 (VI) da tabela periódica, o mesmo grupo do zinco e do cádmio, com o número atómico 80. O seu ponto de fusão é a $-38,9^\circ\text{C}$ e o de ebulição a $356,6^\circ\text{C}$, sendo a densidade de $13,6 \text{ g/cm}^3$ a 25°C (Berlin et al., 2008). Este metal ocorre naturalmente no ambiente e existe segundo diferentes formas. Assim, nos diversos compostos de Hg, este elemento existe num dos três estados de oxidação, designadamente, mercúrio elementar (Hg^0), ião mercurioso (Hg_2^{2+}) ou ião mercúrico (Hg^{2+}). O mercúrio metálico é considerado a forma elementar ou pura do Hg uma vez que não se encontra combinado com outros elementos. Este metal de cor branca-acinzentada é líquido à temperatura ambiente e altamente volátil, emitindo vapores sem cor e sem odor (ATSDR, 1999; Eisler, 2006). A exposição da forma metálica à humidade faz com que esta fique coberta por uma película de óxido mercurioso e, quando aquecida em ar ou em oxigénio, converte-se no óxido mercúrico de cor vermelha. Para além disso, o mercúrio tem a capacidade de dissolver vários metais, formando amálgamas (Eisler, 2006). Por outro lado, os compostos inorgânicos de mercúrio (nos estados de oxidação Hg_2^{2+} ou Hg^{2+}) ocorrem quando o Hg se combina com elementos tais

como o cloro, o enxofre ou o oxigênio, originando os chamados sais mercuriais (ATSDR, 1999; Clarkson et al., 2007). Por último, o mercúrio orgânico é definido como tratando-se dos compostos nos quais o Hg divalente se encontra ligado covalentemente a um ou mais átomos de carbono. Do ponto de vista toxicológico, encontram-se divididos em duas classes: os que se degradam rapidamente a compostos de Hg inorgânico no organismo, como é o caso do fenilmercúrio, e os que apresentam uma maior estabilidade. Este último grupo engloba compostos com uma cadeia alquílica curta e inclui o metil e o etilmercúrio (Clarkson et al., 2007).

1.3. Ciclo biogeoquímico do mercúrio

O mercúrio ocorre naturalmente no sistema biogeoquímico da Terra. No entanto, séculos de atividades antropogénicas causaram a mobilização de quantidades crescentes deste elemento na atmosfera, nos oceanos e nos solos. Por esta razão, o Hg é hoje considerado um poluente global (Selin, 2009). As fontes naturais originárias de Hg correspondem à atividade vulcânica, fogos florestais e combustões naturais, enquanto as fontes antropogénicas se encontram associadas à queima de combustíveis fósseis, explorações de ouro, fábricas de produção de soda cáustica, de metais ferrosos e não-ferrosos ou de cimento e incineração de desperdícios urbanos, médicos ou industriais (Duchemin et al., 2008; Pirrone et al., 2010; Selin, 2009). Apesar disso, as emissões antropogénicas tornaram-se relativamente constantes a partir de 1990 (Selin, 2009). Estima-se que, anualmente, das fontes naturais, resulte uma emissão de Hg para a atmosfera de cerca de 5 207 toneladas e que 2 320 toneladas serão originadas por fontes antropogénicas (Pirrone et al., 2010).

O ciclo global do mercúrio (Figura 1) inicia-se com a evaporação deste composto a partir da superfície do mar e dos solos. O Hg_v^0 é um gás monoatômico quimicamente muito estável e com um tempo de persistência na atmosfera de cerca de um ano (Clarkson et al., 2002). Como tal, consegue distribuir-se na atmosfera de um modo bastante uniforme e atingir áreas remotas do planeta não associadas aos focos industriais de maior poluição (Clarkson et al., 2002; Morel et al., 1998). As fontes antropogénicas também podem contribuir para a emissão de mercúrio para a atmosfera nas formas de Hg^{2+} ou de complexos com partículas, mas, ainda assim, a forma predominante (95%) é o Hg_v^0 uma vez que os dois compostos primeiramente mencionados apresentam um tempo de vida menor na atmosfera (de dias a semanas) e são mais solúveis em água (Morel et al., 1998; Selin, 2009). Assim, na atmosfera, o Hg_v^0 é lentamente oxidado à forma de Hg^{2+} através da ação do ozono mas também, em parte,

do HClO , HSO_3^- e OH^\bullet . O regresso à superfície da Terra ocorre pela sua dissolução e precipitação, sendo que 60% se deposita nos solos e 40% na água (Morel et al., 1998). Em ambientes aquáticos, mas também no solo, o Hg^{2+} pode ser: a) abiótica ou bioticamente reduzido a Hg^0 , que regressa à atmosfera; b) adsorvido em matéria orgânica dissolvida e assim permanecer depositado com sedimentos ou c) transformado em formas alquiladas por ação microbiana (Morel et al., 1998; Selin, 2009). As bactérias redutoras de sulfato são as principais, mas não as únicas, responsáveis pela biometilação do mercúrio. O mecanismo ou mecanismos segundo os quais ocorre a metilação do Hg^{2+} não estão até hoje totalmente esclarecidos, apesar deste se tratar de um processo conhecido há 30 anos. A única explicação mecanística comprovada até à data envolve a via da acetilcoenzima A (Acetil-CoA), na qual o grupo metilo do complexo $\text{CH}_3\text{-THF}$ é transferido por metiltransferases para uma proteína corrinoide, seguido de metilação enzimática (Barkay and Wagner-Döbler, 2005; Choi et al., 1994).

Após esta transformação, o MeHg é prontamente absorvido pelos seres marinhos, bioacumulando-se e biomagnificando os seus níveis na cadeia alimentar aquática. Como resultado disto, as concentrações teciduais mais elevadas são encontradas em animais dos níveis tróficos superiores, tais como, por exemplo, tubarões, peixes-espadas, espadarte e atum, que são espécies predadoras de topo que vivem durante mais tempo e em águas mais profundas. Para além destes, também se pode observar níveis elevados de MeHg em mamíferos marinhos, como as baleias (Oken et al., 2008). As espécies predadoras podem concentrar 10 000 a 100 000 vezes a concentração de mercúrio na água, processo conhecido por biomagnificação. Os fatores que contribuem para esta magnificação podem ser mecanismos de afinidade proteica, nível de oxigénio dissolvido no *habitat* do peixe, tamanho do peixe e/ ou o seu conteúdo em gordura (Cabañero et al., 2004). De facto, o carácter lipofílico do MeHg facilita a sua absorção (Carvalho et al., 2008a).

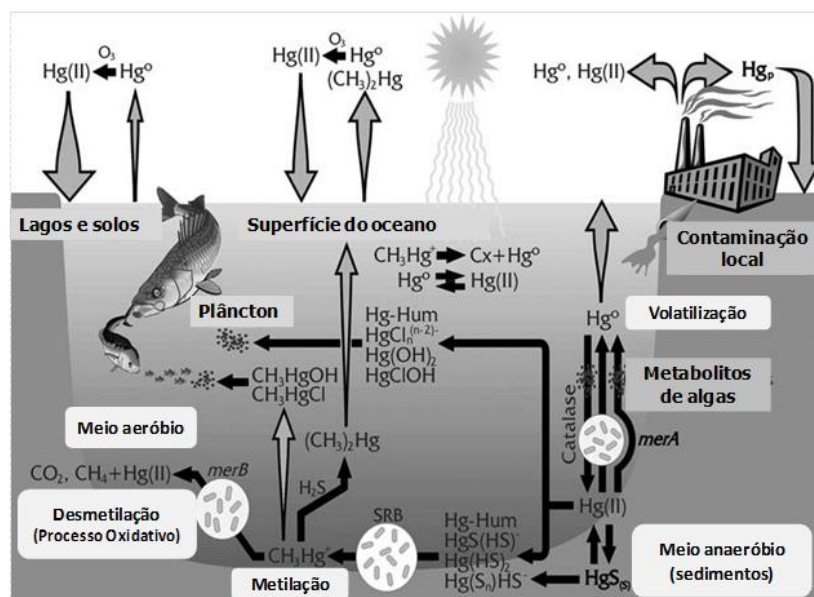


Figura 1 – Ciclo biogeoquímico do mercúrio (adaptado de Barkay and Wagner-Döbler, 2005).

1.4. Mercúrio elementar

1.4.1. Fontes de exposição

A utilização médica e comercial do mercúrio elementar durante séculos conduziu a que, até hoje, se observem exposições acidentais e ocupacionais associadas a este (Clarkson et al., 2003b). Um número significativo de exposições humanas a quantidades biologicamente relevantes de Hg^0 ocorrem no local de trabalho e o contacto dos trabalhadores com este composto advém geralmente da inalação dos seus vapores (Hg_v^0) (WHO, 2003). A absorção dérmica resultante do contacto da pele com ar contaminado pode ocorrer mas é muito pouco significativa, sendo que o mesmo se observa no caso da ingestão da forma metálica e líquida de Hg^0 , uma vez que a sua absorção gastrointestinal é mínima (Caravati, et al., 2008; Rooney, 2007; WHO, 2003). Os tipos de exposição ocupacional que conduzem ao aumento do risco de exposição a esta forma de Hg são diversos: indústria mineira, através da extração direta deste metal do minério ou através do uso de amálgamas com Hg para separar outros metais; produção de medidores elétricos, lâmpadas ou válvulas para rádios; manufatura de material cirúrgico; indústria de feltragem de pelo; produção de barómetros e termómetros e indústria química, na preparação farmacêutica de compostos de mercúrio (Buckell et al., 1946). Para diminuir os riscos associados aos profissionais destes ramos e garantir a sua saúde, estabeleceu-se um limite de exposição ocupacional ao Hg_v^0 de $0,02 \text{ mg Hg/m}^3$ numa jornada

A natureza lipofílica do mercúrio elementar facilita a sua distribuição por todo o corpo, sendo que cerca de 80% do Hg_v^0 se difunde dos alvéolos para o sangue, mas uma porção deste composto (7-14%) permanece inalterada, sendo expirada ao fim de uma semana após a exposição (Clarkson, 2002; Magos, 1997; WHO, 2003). O Hg^0 presente no sangue é oxidado à forma divalente - Hg^{2+} - nos glóbulos vermelhos (Figura 3) (Halbach and Clarkson, 1978). Esta oxidação é especificamente catalisada pela enzima catalase (Cat) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) produzido endogenamente é o outro substrato da reação. Este trata-se de um processo que é inibido pelo etanol e, como tal, a ingestão de quantidades moderadas de bebidas alcoólicas conduz a uma menor retenção de vapor de mercúrio inalado (Clarkson, 2002). Por outro lado, catiões divalentes absorvidos pela exposição a compostos de mercúrio mercúrico podem, por sua vez, ser reduzidos à forma monovalente ou elementar, que é então reoxidada pela catalase, estabelecendo-se, assim, um ciclo de oxidação e redução entre o Hg_v^0 e o Hg^{2+} nas células (Clarkson et al., 2007; WHO, 2003).

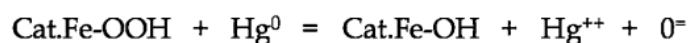
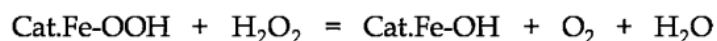
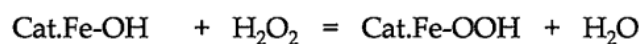


Figura 3 – Metabolização do vapor de mercúrio inalado pela via da catalase e do peróxido de hidrogénio (Clarkson et al., 2007).

O vapor de mercúrio não interage diretamente com os componentes celulares e, portanto, após a sua oxidação, o ião mercúrico (Hg^{2+}) trata-se do responsável direto pela toxicidade induzida pelo Hg_v^0 (Clarkson and Magos, 2006).

O vapor de mercúrio trata-se de um gás monoatômico sem carga e com elevada solubilidade lipídica, o que lhe permite atravessar sem dificuldades membranas celulares por difusão passiva, mas também barreiras mais complexas, como é o caso da barreira hemato-encefálica e da placenta. Deste modo, o sistema nervoso central (SNC) bem como os fetos podem ser afetados. No entanto, antes de atingir o cérebro fetal, o Hg_v^0 tem de primeiro passar pelo fígado fetal e, conseqüentemente, os níveis de Hg no cérebro fetal são mais baixos que os observados no cérebro materno (Clarkson et al., 2007). Finalmente, no cérebro, o mercúrio elementar não oxidado pode ser então oxidado à forma de Hg^{2+} , que fica retido no SNC durante longos períodos de tempo uma vez que é mais difícil para esta forma divalente atravessar a barreira hemato-encefálica (Mottet et al., 1997; WHO, 2003).

Os rins também são órgãos de grande importância na deposição de Hg após a exposição a mercúrio elementar por inalação. Neste caso, a exposição ao mercúrio estimula a produção de metalotioneína, uma proteína de baixo peso molecular, que aumenta o número de ligações ao ião mercúrico segundo um mecanismo de adaptação celular contra a toxicidade de metais. O rim é o principal órgão para a acumulação de mercúrio após a exposição a Hg_v^0 (Falnoga et al., 1994; WHO, 2003). Por sua vez, o fígado é um órgão de grande importância na metabolização do vapor de mercúrio e onde também se observa a oxidação deste a Hg^{2+} (WHO, 2003). O ião mercúrico pode então conjugar-se com selênio (Se), formando precipitados de seleneto de mercúrio (HgSe), no que pode ser visto como um mecanismo de destoxificação do mercúrio (Parizek et al., 1971).

A excreção do mercúrio elementar pode ocorrer por diferentes vias. Assim, apesar do Hg_v^0 dissolvido na corrente sanguínea poder ser expirado eficazmente através dos pulmões, este processo não atinge uma contribuição significativa na eliminação do mercúrio no organismo. A excreção urinária do Hg ocorre pela sua libertação direta dos tecidos renais e não tem origem na filtração glomerular do mercúrio no plasma. A excreção fecal também se trata de uma importante via de eliminação para o Hg^{2+} formado a partir da oxidação do Hg_v^0 . Este processo inicia-se com a sua secreção do fígado para a biliar e, em seguida, para o trato gastrointestinal. O ião mercúrico é assim secretado do fígado para a biliar na forma de um complexo com a glutathione (GSH). A estrutura deste complexo (GS-Hg-SG) é similar à da glutathione oxidada (GSSG) e, como tal, consegue atravessar a membrana das células hepáticas no transportador endógeno para o disseleneto de glutathione. Alguma reabsorção pode ocorrer mas esta é limitada e a maioria do mercúrio biliar é excretado nas fezes (Clarkson et al., 2007).

1.5. Metilmercúrio

1.5.1. Fontes de exposição

Na primeira metade do século XX, as principais preocupações associadas à exposição ao metilmercúrio estavam, na sua maioria, relacionadas com o seu uso em alguns processos industriais e na agricultura enquanto fungicida (Ahlmarm, 1948). No entanto, o uso do MeHg como fungicida foi abandonado e, atualmente, a principal via de exposição da população a este tóxico consiste no consumo de peixe, produtos derivados de peixe e mamíferos marinhos (Feng et al., 2008). Dado a grande importância deste grupo de alimentos, a União Europeia legislou a quantidade máxima de Hg que pode existir no peixe para consumo humano. Assim,

este valor foi fixado a 0,5 mg/Kg de peso líquido para os peixes não-predadores e crustáceos e a 1 mg/Kg de peso líquido para os peixes predadores, como, por exemplo, o atum, peixe-espada ou bacalhau (CEC, 2006). A contribuição de outros alimentos para a exposição ao MeHg é muito pouco significativa, embora este possa advir da água, cereais, vegetais e carne em quantidades reduzidas (Chapman and Chan, 2000). Para além disso, em algumas zonas contaminadas e que existem, por exemplo, na China, pode-se observar uma acumulação significativa de metilmercúrio no arroz (Feng et al., 2008). Relativamente aos alimentos, é ainda importante considerar-se que o MeHg não é removido nem destruído pela cozedura, fritura ou fumagem destes (Miklavčič et al., 2012).

Nas décadas de 50 e de 60 do século XX ocorreram envenenamentos de larga escala causados pelo MeHg. No Japão, a epidemia manifestou-se em Minamata de 1953 a 1960 e em Niigata de 1960 a 1965. Ambas foram causadas pelo despejo de resíduos industriais contendo metilmercúrio e mercúrio inorgânico numa baía, no caso de Minamata, e num rio, no caso de Niigata. Estes contaminantes eram oriundos de fábricas de produção de acetaldeído, nas quais um composto inorgânico de mercúrio era usado como catalisador. Os produtores não sabiam que o processo sintético usado convertia algum do mercúrio à forma de metilmercúrio. Por sua vez, no Iraque, duas epidemias foram registadas em 1956 e em 1960, nas quais mais de 372 pessoas foram envenenadas pelo consumo de pão feito com cereais tratados com metilmercúrio como fungicida (Clarkson, 1998; Clarkson et al., 2003a; Rustam and Hamdi, 1974). Estes acontecimentos alertaram para a toxicidade do MeHg a nível mundial, o que, por sua vez, levou a que as agências reguladoras estabelecessem níveis seguros de ingestão de alimentos com mercúrio (Tabela 1).

Tabela 1 – Recomendação de valores de ingestão de mercúrio seguros para a população humana por diferentes agências reguladoras internacionais.

| Agência | Tipo de Guia | Valor | Referência |
|--------------------|--------------|-------------------------|------------------|
| WHO – JECFA | PTWI | 1,6 µg Hg/Kg pc/semana* | WHO/ JECFA, 2003 |
| EPA | RfD | 0,1 µg Hg/Kg pc/dia* | EPA, 2001 |
| ATSDR | MRL | 0,3 µg Hg/Kg pc/dia* | ATSDR, 1999 |
| WHO | PTWI | 1,6 µg Hg/Kg pc/semana* | WHO, 2006 |
| | | 3,3 µg Hg/Kg pc/semana* | |

PTWI – *Provisional Tolerable Weekly Intake*; RfD – *Reference Dose*; MRL – *Minimal Risk Level*; pc – peso corporal. *Indicação reservada a mulheres grávidas e a crianças. *Indicação para a população em geral.

Portugal é o país na Europa onde se consome mais peixe com uma ingestão anual de 57 Kg *per capita*. A nível mundial, Portugal ocupa o terceiro lugar em termos de consumo, sendo apenas ultrapassado pela Islândia e pelo Japão. No nosso país, as comunidades piscatórias são mais suscetíveis à exposição ao MeHg uma vez que o seu consumo de peixe é mais frequente do que o do resto da população e muitas vezes envolve espécies predadoras. De facto, o índice de risco para estas comunidades é mais elevado do que em outros locais do país (Carvalho et al., 2008a). Tendo em consideração que o MeHg se poderá tratar de um risco relevante para a saúde da população portuguesa, a ASAE avaliou esta exposição através da determinação dos níveis de Hg presentes em diferentes espécies de peixes – Tabela 2 (ASAE, 2009).

Tabela 2 – Níveis de mercúrio detetados em algumas espécies de peixes capturados em águas portuguesas (adaptado de ASAE, 2009).

| Espécie (Nome Comum) | Limite Máximo (mg/Kg) | Concentração de Hg (mg/Kg de peso fresco) |
|---------------------------------|----------------------------------|--|
| Areeiro | 0,5 | 0,46 |
| Atum fresco | 1 | <0,05 – 1,69 |
| Cantarilho | 0,5 | 0,68 |
| Carapau | 0,5 | <0,05 – 0,63 |
| Cherne | 0,5 | 0,68 |
| Espadarte | 1 | <0,05 – 2,35 |
| Peixe-espada preto | 1 | 0,47 – 0,90 |
| Sardinha | 0,5 | 0,05 |
| Tamboril | 1 | 0,38 |
| Tubarão | 1 | 1,34 |

No entanto, apesar da presença deste tóxico, do consumo de peixe advêm vários benefícios para a saúde que não devem ser esquecidos. O peixe trata-se de uma boa fonte de nutrientes. O seu elevado conteúdo proteico é bem digerido e o consumo de peixe aumenta a absorção de zinco, de ferro e de cálcio, tratando-se também de uma boa fonte de selénio (Dorea, 2003). No entanto, a sua ingestão é particularmente relevante graças ao seu conteúdo em ácidos gordos polinsaturados n-3 (n-3 PUFAs). Destes, os ácidos eicosapentaenóico 20:5 (EPA) e docosahexaenóico 22:6 (DHA) desempenham um papel especialmente importante no desenvolvimento neurológico humano e, para além disso, também na formação e manutenção

da integridade das membranas celulares, no funcionamento do cérebro, retina, fígado, rins, glândulas e gónadas e na produção de uma hormona envolvida na regulação da pressão sanguínea e da resposta inflamatória. Apesar dos seres humanos conseguirem sintetizar parte dos n-3 PUFA de que necessitam a partir do precursor ALA, normalmente esta quantidade não é suficiente para responder às necessidades diárias e daí a grande importância da obtenção destes ácidos gordos essenciais a partir de uma dieta envolvendo o consumo de peixe, que os obtêm a partir das algas. Os fetos apresentam uma capacidade limitada de síntese de DHA, que recebem essencialmente da mãe através da placenta. Um maior consumo de peixe por parte da mãe, indicando uma ingestão maior de n-3 PUFA, encontra-se associado a uma melhoria nas capacidades cognitivas e visuais das crianças (Mahaffey et al., 2011).

Os resultados dos estudos epidemiológicos efetuados na República das Seychelles, Nova Zelândia e Ilhas Faroé, onde a dieta da população inclui refeições frequentes com peixe (baixos níveis de Hg), refeições ocasionais com carne de baleia (elevados níveis de Hg) e refeições ocasionais com tubarão (elevados níveis de Hg), respetivamente, apontam para a importância das práticas dietéticas na suscetibilidade à toxicidade do mercúrio. Assim, apesar da exposição ao mesmo tóxico, algumas populações experimentaram alterações neurotóxicas, enquanto outras não (Chapman and Chan, 2000; Clarkson and Magos, 2006). Os estudos efetuados na Nova Zelândia e nas Ilhas Faroé demonstraram que o consumo continuado de produtos marinhos com elevados níveis de Hg por mulheres grávidas originou resultados mais baixos quando os seus filhos foram testados cognitivamente (Karatela et al., 2011). Já o estudo efetuado na República das Seychelles demonstrou resultados contrários, visto que, neste caso, a exposição pré-natal ao MeHg não resultou no aparecimento de efeitos adversos no desenvolvimento das crianças (Davidson et al., 1998).

Assim, os conhecimentos que se têm atualmente sobre a toxicidade do MeHg permitem concluir que as crianças se tratam do subgrupo da população mais suscetível a este composto uma vez que o seu sistema nervoso central ainda se encontra em processo de maturação. No entanto, o elevado valor nutricional do peixe faz com que o seu consumo seja recomendado 2 a 3 vezes por semana uma vez que não existe um substituto na dieta para ele (Carvalho et al., 2008a; Dorea, 2003). Do ponto de vista pré-natal, as mães que privilegiam o consumo de peixe rico em n-3 PUFA e com baixos níveis de metilmercúrio têm, geralmente, crianças com capacidades cognitivas superiores, melhor desenvolvimento motor e também da fala. Assim, o consumo de peixes como o salmão, o carapau e a sardinha deve ser preferido uma vez que apresentam um conteúdo de n-3 PUFA elevado e um conteúdo em MeHg bastante reduzido (Mahaffey et al., 2011).

1.5.2. Toxicocinética

O metilmercúrio pode ser absorvido por diferentes vias, mas a que mais se destaca é a via oral. Após ser ingerido, cerca de 95% do MeHg é eficazmente absorvido pelo trato gastrointestinal (EPA, 2001). Tal acontece pelo facto do MeHg se tratar de um composto altamente reativo e que rapidamente forma complexos com grupos sulfidrilo (-SH) presentes em aminoácidos como a cisteína (Cys), formando-se o complexo MeHg-Cys (Figura 4). Este complexo apresenta uma estrutura análoga à do aminoácido metionina (Met), podendo mimetizá-lo a nível molecular. Visto que a Met se trata de um substrato do sistema de transporte de aminoácidos neutros LAT, o complexo MeHg-Cys pode atravessar a barreira hemato-encefálica usando este sistema de transporte (Roos et al., 2010).

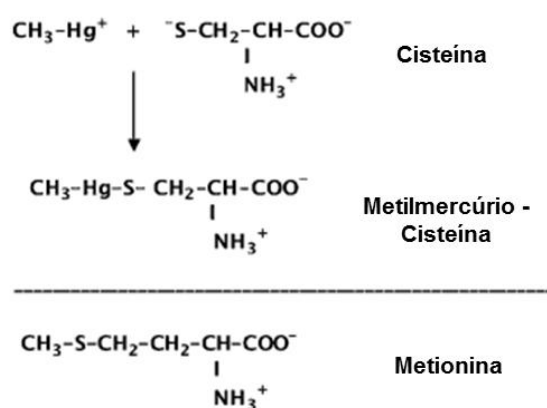


Figura 4 – Fórmula química do complexo formado pelo metilmercúrio com o aminoácido cisteína e do aminoácido metionina (adaptado de Clarkson et al., 2007).

A distribuição do MeHg é efetuada pelo sangue, o que permite que atinja todos os tecidos do organismo (EPA, 2001). Este processo está concluído cerca de 30 a 40 horas após a ingestão de uma única refeição contendo peixe (MDCH/ATSDR, 2009). No entanto, apenas 5% do MeHg absorvido permanece no compartimento sanguíneo, onde a sua concentração nos glóbulos vermelhos é cerca de 20 vezes superior à sua concentração no plasma, onde está ligado à albumina (Clarkson et al., 2003a; Yasutake et al., 1989). Do ponto de vista biológico, um dos aspetos mais importantes no seu processo de distribuição é o facto de conseguir atravessar com facilidade a barreira hemato-encefálica, atingindo o SNC, bem como a placenta dos humanos e dos animais (Clarkson et al., 2007).

A metabolização do MeHg ocorre principalmente no fígado, onde se pode conjugar com a glutatona, sendo depois excretado através da biliar para o lúmen intestinal (Clarkson, 2002;

Mottet et al., 1997). Foi observada uma forte correlação entre os níveis de GSH e a excreção do MeHg para a bÍlis, o que evidencia que o transporte de MeHg para a bÍlis ocorre de facto na forma de um complexo com a glutathione (Dutczak and Ballatori, 1994). Inicia-se assim um prolongado ciclo enterohepático onde o MeHg é novamente excretado para a bÍlis e parcialmente reabsorvido na circulação porta hepática, regressando então ao fÍgado. Uma porção do mercúrio biliar é lentamente convertido em mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) nos intestinos pela microflora a uma taxa de cerca de 1% por dia. Alguma desmetilação pode também ocorrer ao nível das células fagocitárias. Assim, apesar do MeHg se tratar da forma predominante aquando da exposição, o Hg^{2+} vai-se acumulando lentamente, podendo residir durante longos períodos de tempo no sistema nervoso central (Clarkson, 2002).

Apesar do processo que ocorre ao nível dos intestinos ser muito pouco eficaz, a maioria do MeHg no organismo é eliminado pela desmetilação e excreção do Hg^{2+} nas fezes (90%) e pela via biliar, na forma de um complexo com a glutathione. A excreção pela via urinária é muito reduzida, correspondendo a apenas 10% ou menos da eliminação total (Berglund et al., 2005; Clarkson, 2002). No entanto, existe uma tendência para o aumento da excreção por esta via com a idade, o que poderá estar relacionado com o aumento da concentração de Hg^{2+} nos rins após exposição ao MeHg (EPA, 2001; Mottet et al., 1997; Watanabe, 2002). Finalmente, o MeHg também pode ser excretado pelo leite materno e pela placenta (EPA, 2001).

1.6. Efeitos tóxicos

Os efeitos tóxicos causados pelo mercúrio podem variar dependendo da dose e da duração da exposição, sendo que os sintomas podem intensificar-se, tornar-se irreversíveis e culminar em morte (Clarkson and Magos, 2006; WHO, 2003).

1.6.1. Exposição aguda

No caso de ocorrer uma exposição aguda, o primeiro sintoma costuma ser a diarreia, caracterizada por fezes líquidas e com algum sangue misturado. Para além disso, muitas vezes apresentam pedaços de membranas mucosas associadas. A perda das barreiras mucosas intestinais resulta numa absorção excessiva de mercúrio e na sua distribuição para os rins, onde provoca danos severos. O tenesmo também se trata de uma característica marcante e que é geralmente acompanhada por fortes dores na região baixa do abdómen. Em alguns casos, os doentes podem chegar a vomitar mesmo que a via de exposição não tenha sido a

oral. Observa-se uma clara redução nos níveis de urina, o que poderá mesmo evoluir para uma situação de anúria. Nestas condições, a urina que consegue ser efetivamente excretada apresenta eritrócitos e leucócitos bem como albumina e cilindros urinários granulares e epiteliais. Dores de cabeça e sonolência são os sintomas seguintes e a morte por uremia pode ocorrer após alguns dias (Buckell et al., 1946; Tchounwou et al., 2003). A exposição aguda a concentrações elevadas de Hg^0 origina efeitos pulmonares severos, tais como pneumonia intersticial, bronquite necrotizante e pneumonite química, envolvendo sintomas como tosse, dispneia e dores no peito (Clarkson, 1998; Tchounwou et al., 2003). As acumulações difusas que se observam nas primeiras radiografias da cavidade torácica evoluem para edema pulmonar, desconforto respiratório e descamação do epitélio bronquiolar, podendo mesmo resultar em morte por falha respiratória (Tchounwou et al., 2003). Finalmente, é também importante considerar-se que a exposição aguda pré-natal ou pós-natal a níveis elevados de MeHg afeta adversamente o desenvolvimento do sistema nervoso, podendo resultar em atraso mental, convulsões, paralisia cerebral e até mesmo na morte, estando estes sintomas associados à desorganização da citoarquitettura do córtex cerebral e atrofia severa das folhas dos hemisférios do cerebelo (Carratù et al., 2006; Tchounwou et al., 2003). No entanto, se a exposição aguda ao MeHg envolver níveis mais reduzidos e ocorrer no início ou no fim do período gestacional, tal não deverá resultar em danos significativos das funções cerebrais (Carratù et al., 2006).

1.6.2. Exposição crónica

A exposição crónica trata-se do tipo de exposição que mais se observa na população em geral (Clarkson et al., 2003a) e, como tal, os efeitos tóxicos que causa na saúde humana são de especial interesse.

1.6.2.1. Neurotoxicidade

O sistema nervoso é mais sensível aos efeitos do mercúrio do que qualquer outro sistema do organismo humano e, para além disso, nenhum outro metal consegue afetá-lo tão adversamente (Clarkson et al., 1998; Tchounwou et al., 2003). Tal como já foi referido anteriormente em 1.4.2. e em 1.5.2., tanto o Hg_v^0 como o MeHg conseguem atravessar a barreira hemato-encefálica e acumular-se no sistema nervoso central (Clarkson et al., 2007). Apesar disso, os efeitos tóxicos que produzem diferem entre si (Magos, 1997).

A exposição crónica ao Hg_v^0 resulta primeiramente em danos no sistema nervoso central. Os primeiros sinais não específicos podem incluir insónia, problemas de memória, perda de apetite e algum tremor, o que, algumas vezes, conduz ao diagnóstico errado da doença como sendo do foro psiquiátrico (Tchounwou et al., 2003). No entanto, a continuação da exposição conduz a um agravamento da situação do doente que é caracterizada por uma tríade de sintomas envolvendo tremores mais severos, gengivite e eretismo. O último inclui um largo espectro de perturbações da personalidade que pode resultar em profundas alterações no comportamento dos indivíduos, que podem experimentar delírio, alucinações, timidez excessiva e ataques de raiva (Clarkson et al., 1998). Assim, de uma maneira geral, as alterações neurocomportamentais causadas pelo vapor de mercúrio encontram-se classificadas em quatro grupos: 1) distúrbios do sistema motor; 2) deterioração da capacidade intelectual; 3) alteração do estado emocional e 4) neurotoxicidade periférica (Kishi et al., 1994). Os efeitos causados no SNC pelo Hg_v^0 são, por norma, reversíveis mas foi já demonstrado que trabalhadores ocupacionalmente expostos a este composto ainda sentem alguns efeitos, especialmente ao nível da coordenação motora, durante vários anos após o fim da exposição (Ellingsen et al., 1993a; Kishi et al., 1994). De facto, a taxa de eliminação do Hg_v^0 é muito mais lenta no cérebro do que nos restantes órgãos (Gage, 1961).

A exposição crónica ao MeHg conduz a resultados diferentes conforme atua no SNC adulto ou no SNC em desenvolvimento. A intoxicação nos adultos é caracterizada pela existência de um período de latência entre a exposição ao MeHg e o aparecimento dos sintomas, podendo variar de semanas a meses conforme a dose e o período de exposição. A parestesia, que se trata de uma sensação de dormência ou de formigueiro, é o primeiro sintoma a surgir com a dose mais baixa de exposição. O quadro clínico pode então progredir para ataxia cerebral, disartria, constrição do campo visual e perda da audição (Clarkson et al., 2002). Estes sintomas são causados por alterações na estrutura e na maquinaria bioquímica tanto dos neurónios como dos astrócitos (Franco et al., 2009). Para além disso, em todas as espécies, observa-se que o MeHg origina a perda de células e a redução do tamanho cerebral (Lewandowski et al., 2003). Exames patológicos de doentes intoxicados com MeHg demonstraram que o córtex cerebral é a zona mais afetada, onde as células granulares são particularmente suscetíveis à ação deste tóxico (Atchison and Hare, 1994).

Os efeitos neurotóxicos causados pelo MeHg no sistema nervoso central em desenvolvimento originam graves distúrbios no desenvolvimento mental e motor. As crianças de grávidas expostas ao MeHg demonstram grandes dificuldades em mastigar, engolir, falar, gatinhar ou em qualquer outra atividade envolvendo movimentos coordenados ou

involuntários (Ekino et al., 2007). A sua capacidade intelectual encontra-se diminuída e também apresentam distúrbios de personalidade e crises epiléticas (Dórea et al., 2012; Ekino et al., 2007). Os danos causados pelo MeHg ao SNC fetal humano e animal estão associados a uma diminuição no número de células neuronais e a uma alteração da sua citoarquitura, interferindo em processos como a divisão, migração, diferenciação e morte celulares, que regulam o desenvolvimento neuronal (Tamm et al., 2006).

A neurotoxicidade induzida pelo MeHg tem sido atribuída a três mecanismos principais: indução de *stress* oxidativo por aumento da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), perturbação dos níveis de Ca^{2+} intracelulares e interação com os grupos sulfidrílo de diversas moléculas (Farina et al., 2011). O MeHg liga-se covalentemente aos grupos sulfidrílo, provocando, desta forma, a inibição de enzimas e de moléculas não proteicas como a glutathione. Esta apresenta capacidades redutoras determinadas pelas propriedades nucleofílicas do seu grupo tiol mas também uma ação antioxidante sustentada por várias enzimas que catalisam a sua interação com moléculas electrofílicas exógenas e endógenas (Farina et al., 2011). De entre estas enzimas, as mais importantes tratam-se da glutathione peroxidase (GPx) e da glutathione redutase (GR), participando na destoxificação dos peróxidos e na redução da glutathione oxidada. A atividade destas enzimas e a manutenção da razão GSH/GSSG são essenciais para a proteção das células contra danos oxidativos. No entanto, é de notar que o MeHg pode induzir *stress* oxidativo por interação direta com os grupos nucleofílicos das proteínas, mesmo na ausência de alterações significativas nos níveis de GSH ou na razão GSH/GSSG (Farina et al., 2011). O complexo MeHg-Cys consegue penetrar no SNC e o MeHg interrompe então a cadeia mitocondrial de transporte eletrónico, conduzindo ao aumento da formação de ROS, tais como peróxido de hidrogénio e anião superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). O MeHg reage também com a glutathione, conduzindo à diminuição dos seus níveis pela formação do complexo MeHg-GSH, que é excretado. Para além disso, também dificulta a atividade das enzimas GR e GPx no sistema nervoso central no período pós-natal inicial. Todos estes acontecimentos culminam no aumento do *stress* oxidativo e da formação de ROS. A perda da homeostase do glutamato no SNC também se trata de um importante alvo na neurotoxicidade induzida pelo MeHg (Farina et al., 2011). O glutamato (GLU) trata-se do principal neurotransmissor excitatório do SNC mamífero e a sua libertação da fenda sináptica consiste no evento chave para terminar a transmissão do sinal (Fonfria et al., 2005). A Figura 5 representa uma sinapse tripartida onde o MeHg inibe a entrada do GLU para o astrócito (i) e aumenta a libertação de GLU a partir do neurónio pré-sináptico (ii). Quando o GLU se encontra em concentrações elevadas na fenda sináptica atua como uma toxina. As elevadas

concentrações extracelulares de GLU devido a (i) e a (ii) sobreactivam os recetores N-metil-D-aspartato (NMDA) (iii). Este acontecimento conduz, por sua vez, ao aumento do fluxo de Ca^{2+} para os neurónios pós-sinápticos, causando a ativação de vias de morte celular (iv). Alternativamente, o Ca^{2+} internalizado pela mitocôndria poderá causar disfunção mitocondrial e aumentar a produção de ROS (v). O último acontecimento também pode ser diretamente estimulado pelo MeHg (vi) e níveis mais elevados de ROS podem diminuir diretamente a entrada de GLU nos astrócitos (vii) (Farina et al., 2011).

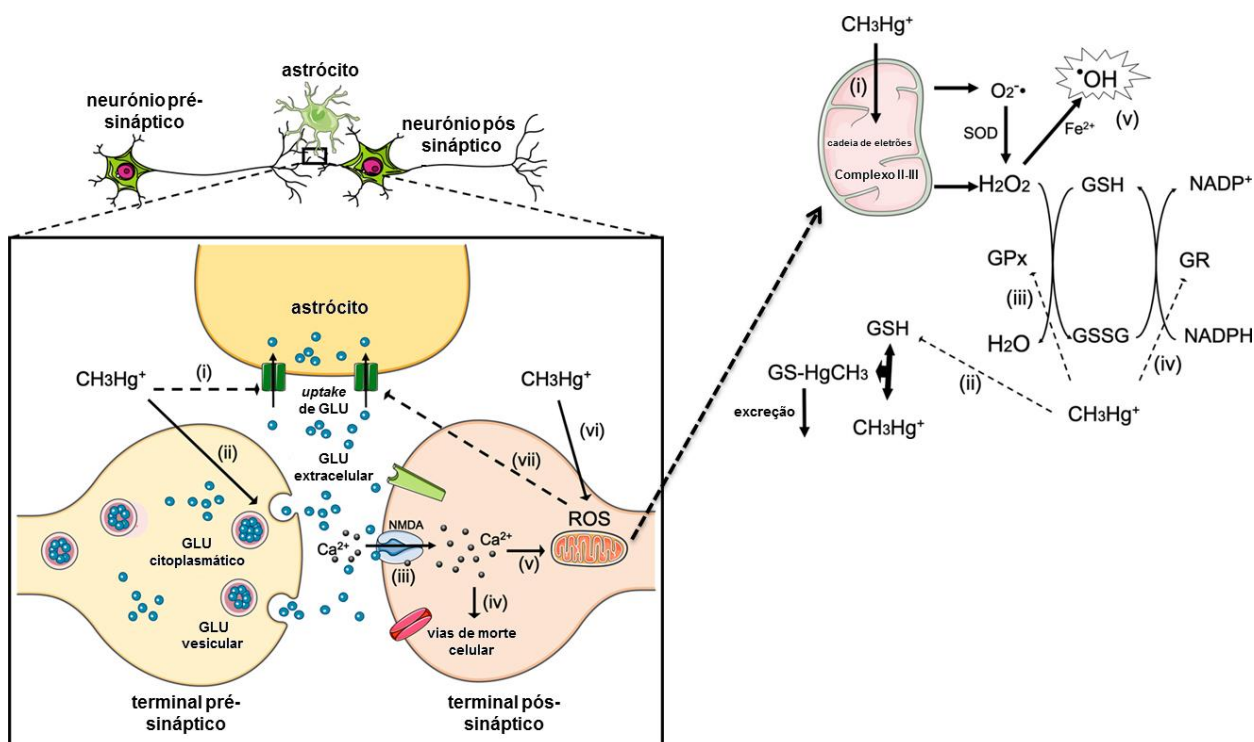


Figura 5 – Relação entre *stress* oxidativo induzido pelo MeHg, níveis de Ca^{2+} e perda de homeostase pelo glutamato (adaptado de Farina et al., 2011).

Tanto o MeHg como o Hg^{2+} podem afetar a homeostase do glutamato, impedindo o seu *uptake* pelos astrócitos, o que prejudica a integridade da relação neurónio-astrócito e afeta vários aspetos operacionais e morfológicos do sistema nervoso central (Aschner et al., 1994; Fonfria et al., 2005).

1.6.2.2. Imunotoxicidade

O mercúrio, tal como acontece com outros metais, apresenta um potente poder citotóxico sobre tipos específicos de células, entre as quais as do sistema imunitário (Tchounwou, et al., 2003). De facto, o mercúrio pode afetar profundamente este sistema a

concentrações muito mais baixas do que as necessárias para causar dano ao sistema nervoso central e aos rins (Vas and Monestier, 2008).

Dependendo da forma de mercúrio em causa, tanto a imunossupressão como a imunoestimulação podem ser observadas (Vas and Monestier, 2008). Assim, o mercúrio inorgânico apresenta, no geral, um efeito de imunoestimulação, conseguindo induzir a proliferação de células T adultas apesar deste efeito não ocorrer nos linfócitos B nem nos tímócitos. Para além disso, estimula a autoimunidade (Havarinasab and Hultman, 2005). A exposição de indivíduos ao mercúrio elementar e inorgânico através de atividades ocupacionais produz um aumento nos níveis de citocinas bem como um aumento da presença de anticorpos antinucleares (ANA) e antinucleolares (ANoA) no soro (Gardner et al., 2010). Pelo contrário, o MeHg atua inicialmente como um imunossupressor mas a sua conversão à forma de Hg^{2+} , possibilita, posteriormente, a estimulação do sistema imunitário, induzindo a produção de autoanticorpos e aumentando os níveis de citocinas em circulação (Havarinasab and Hultman, 2005).

A modulação da resposta das citocinas e dos anticorpos pelo mercúrio pode afetar a suscetibilidade dos indivíduos expostos a este tóxico a doenças que envolvam a ativação do sistema imunitário, tais como doenças autoimunes e alergias. Para além disso, também pode desencadear uma alteração na relação entre hospedeiro e agente patogénico e assim afetar a suscetibilidade a doenças infecciosas (Gardner et al., 2010). Como tal, estudos efetuados em comunidades ou em populações expostas a níveis reduzidos de MeHg ou de Hg_v^0 demonstraram que as vias de sinalização das citocinas são afetadas, causando uma desregulação no sistema imunitário. As alterações registadas no soro envolvem modificações nos níveis tanto das citocinas pró-inflamatórias como das citocinas anti-inflamatórias (Nyland et al., 2011).

O sistema imunitário em desenvolvimento também é um alvo potencial do mercúrio. Um estudo epidemiológico envolvendo uma população de uma zona marítima do Canadá demonstrou que os recém-nascidos de mulheres expostas a MeHg por via alimentar apresentavam uma diminuição na proporção de células $CD4^+CD45RA^+$ e nos níveis de IgM no sangue do cordão umbilical (Tonk et al., 2010).

1.6.2.3. Cardiotoxicidade

Os efeitos cardíacos originados por compostos mercuriais incluem hipertensão, aterosclerose, doença arterial coronária (DAC), enfarte agudo do miocárdio, arritmias

cardíacas, variações na frequência cardíaca, acidente vascular cerebral (AVC) e morte súbita por falha cardíaca. Os efeitos tóxicos produzidos pelo Hg a nível vascular também são relevantes e estão relacionados com *stress* oxidativo, inflamação, trombose, disfunção endotelial, biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) reduzida, disfunção imune, dislipidemia e disfunção mitocondrial (Houston, 2011). De facto, a exposição ao Hg está associada ao aumento do risco de mortalidade por doença cardiovascular (Fillion et al., 2006). Aquando do acidente de Minamata observou-se que os residentes dessa área apresentavam uma taxa de mortalidade aumentada devido a doenças cardíacas, tais como arritmia, endocardite e miocardite (Inoue et al., 2012). O aumento do risco de doenças coronárias pela exposição ao MeHg através da dieta foi também observado em caçadores de baleias nas Ilhas Faroe (Choi et al., 2009). Nas populações que se alimentam de peixe, o mercúrio acumula-se no coração a níveis comparáveis aos encontrados no cérebro (Chan and Egeland, 2004).

O mecanismo segundo o qual o mercúrio produz efeitos tóxicos no sistema cardiovascular ainda não se encontra totalmente elucidado mas acredita-se que a base deste poderá envolver um aumento no *stress* oxidativo, provocando um aumento na produção de radicais livres e uma redução na atividade de enzimas antioxidantes, como a GPx (Azevedo et al., 2012). Para além disso, a formação e migração das células endoteliais parece diminuir, o que, por sua vez, diminui a reparação endotelial e os níveis de NO, conduzindo à disfunção endotelial (Houston, 2011). A hipertensão, a interação entre selénio e mercúrio e a peroxidação lipídica podem ser etapas intermédias entre a exposição ao Hg e as doenças cardiovasculares (Yorifuji et al., 2010).

O peixe trata-se de um alimento cuja composição inclui compostos com propriedades que podem ser cardioprotetoras ou cardiotóxicas conforme as substâncias em causa. É considerado um alimento saudável por ser rico em proteínas e pobre em gorduras saturadas (Fillion et al., 2006). Apesar disso, existe a preocupação de que o conteúdo elevado de mercúrio no peixe anule os efeitos cardioprotetores resultantes do consumo deste alimento, que são devidos ao seu conteúdo em selénio e em ácidos gordos n-3 PUFA e que podem existir em maior ou menor quantidade no peixe (Budtz-Jørgensen, et al., 2007). Como tal, tendo em conta que populações diferentes tendem a consumir espécies de peixe também diferentes, o risco de efeitos cardiovasculares tem de ser ponderado não só tendo em conta a exposição ao MeHg mas também a ingestão dos ácidos gordos n-3 PUFA (Stern, 2005). Para além disso, também é importante considerar-se que o Hg se liga ao Se, diminuindo a disponibilidade do último e esta deficiência poderá estar relacionada com o agravamento dos

efeitos cardiovasculares causados por este elemento (Boffetta et al., 2001; Houston, 2011; Venardos et al., 2004; Wu et al., 2003).

1.6.2.4. Nefrotoxicidade

O rim trata-se do principal órgão alvo para os compostos de mercúrio inorgânico e também o principal tecido de acumulação de mercúrio no organismo. Como tal, existem várias evidências que apontam para que a exposição crónica a doses baixas de mercúrio provoque danos nos rins (Al-Madani, et al., 2009; Pingree et al., 2001). A exposição ocupacional ao Hg_v^0 acarreta perigos para os trabalhadores e estes podem estar relacionados com alterações tanto glomerulares como tubulares. As primeiras estão associadas a um aumento na prevalência de proteinúria de elevado peso molecular enquanto as alterações tubulares muitas vezes conduzem a um aumento da excreção urinária de enzimas – fosfatase alcalina intestinal, N-acetil-beta-glucosaminidase e taptigargina (THG) (Cárdenas et al., 1993; Ellingsen et al., 1993b). De facto, a excreção urinária de THG parece ser um dos primeiros sintomas de alteração renal causada pela exposição ao Hg_v^0 , enquanto a tubulotoxicidade do Hg poderá estar associada à inibição do transporte de Na^+ no túbulo proximal ou na ansa de Henle, causando um aumento compensatório na reabsorção de sódio em troca pela excreção de H^+ nos túbulos proximais (Cárdenas et al., 1993). A exposição a mercúrio inorgânico conduz ainda à diminuição do volume urinário e da excreção urinária de creatinina e, pelo contrário, a um aumento da excreção de γ -glutamyltransferase (γ -GGT) (Al-Madani et al., 2009).

Existem menos evidências dos efeitos na função renal causados pela exposição prolongada a doses baixas de metilmercúrio em humanos. No entanto, em murganhos e ratos, foi observado que uma exposição com estas características resulta em nefropatia crónica, incluindo fibrose intersticial e degeneração epitelial dos túbulos proximais. Nas várias vítimas da intoxicação em massa que ocorreu no Iraque foram registados sintomas de dano renal tais como poliúria e albuminúria. Pensa-se que a toxicidade renal do MeHg poderá advir da sua degradação à forma inorgânica (Ohno et al., 2007).

1.6.2.5. Teratogenicidade

Tal como foi referido anteriormente em 1.4.2. e em 1.5.2., o Hg_v^0 e o MeHg têm a capacidade de atravessar a placenta e afetar o feto. No entanto, o Hg_v^0 não é tão eficaz neste processo uma vez que tem de ser primeiro oxidado à forma de Hg^{2+} no fígado fetal e, portanto,

os níveis de mercúrio no cérebro do feto são inferiores aos observados no cérebro da mãe (Clarkson et al., 2007). Estudos em animais demonstraram que doses reduzidas de mercúrio inorgânico conseguem entrar nos tecidos fetais, podendo causar aborto, atrasos no crescimento, edema subcutâneo, encefalia e anoftalmia. Para além disso, outros efeitos teratogénicos como fissura labiopalatal, fusão das costelas e sindactilia foram também observados. Também é conhecido o efeito teratogénico do MeHg em diversos órgãos de ratos, murganhos e *hamsters*. A exposição a este composto durante o período fetal resulta, frequentemente, em malformações do esqueleto, defeitos nas costelas, calcificação anormal do esqueleto, fissura labiopalatal, micrognatismo e pé boto (Tchounwou et al., 2003). Tanto o MeHg como o Hg_v^0 são excretados para o leite materno e, portanto, crianças que estão a ser amamentadas podem também ser expostas a este tóxico (Bose O'Reilly et al., 2008).

Assim, a primeira fase da infância juntamente com o período fetal tratam-se das fases de vida mais suscetíveis aos efeitos teratogénicos dos compostos de mercúrio (Clarkson and Magos, 2006), embora este tipo de efeitos possa também ser posteriormente observado na vida adulta. Um estudo efetuado em Hong Kong chegou à conclusão de que mais de um terço dos parceiros masculinos em casais inférteis apresentava concentrações elevadas de mercúrio no sangue. Embora os resultados não tenham sido estatisticamente significativos, observou-se uma tendência de declínio em vários critérios de qualidade do sémen quando os níveis de mercúrio no sangue eram mais elevados. Por sua vez, um estudo efetuado com trabalhadores expostos a Hg_v^0 demonstrou que estes apresentavam hipospermia e um aumento considerável no número anormal de espermatozoides por ejaculação (Heath et al., 2012). No entanto, é ainda necessário desenvolver-se mais estudos para avaliar o papel do mercúrio na reprodução e nos indicadores de fertilidade, tais como a produção de esperma, taxas de conceção e taxa de gravidezes concluídas com sucesso (NRC, 2000).

1.6.2.6. Carcinogenicidade

Estudos recentes demonstraram que o mercúrio tem a capacidade de induzir citotoxicidade e ativar, por transcrição, um número significativo de genes de *stress* em células humanas de carcinoma hepatóide, incluindo os que se encontram envolvidos na regulação do ciclo celular e da apoptose. Para além disso, existem algumas evidências que apontam para que mecanismos tanto genotóxicos como não genotóxicos contribuam para a carcinogenicidade renal do mercúrio (Tchounwou et al., 2003). Apesar de em certos casos se ter verificado a existência de aberrações cromossómicas a doses de MeHg mais elevadas

nalguns indivíduos, considera-se que os estudos efetuados são ainda inconclusivos e, portanto, a genotoxicidade do MeHg trata-se apenas de uma hipótese. Nos animais, a doses tóxicas para os rins, observou-se que a exposição crónica a MeHg aumentou a incidência de tumores renais. Apesar disso, na ausência de um iniciador tumoral, a exposição de longo termo a doses subtóxicas de MeHg não surtiu o mesmo efeito. Como tal, este tipo de efeito tóxico do mercúrio necessita de ser mais estudado e, assim, com base em informações disponíveis sobre humanos e sobre animais, o MeHg está classificado como um possível carcinogénico pela IARC (grupo 2B) e pela EPA (NRC, 2000).

2. Introdução ao estudo do selênio

2.1. Importância biológica do selênio

O selênio (do grego σελήνη ou *selene*) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius quando analisava um depósito de cor vermelha nas paredes de chumbo de câmaras usadas para a produção de ácido sulfúrico (Papp et al., 2007; Tinggi, 2003). É classificado quimicamente como um metaloide, estando posicionado no grupo 16 (IV) da tabela periódica, o mesmo grupo do enxofre e do telúrio, com o número atômico 34 (Tinggi, 2003). Nos diversos compostos de selênio, este existe normalmente num dos quatro estados de oxidação: Se^{6+} (selenato), Se^{4+} (selenito), Se^{2-} (seleneto) e Se^0 (selênio elementar) (OEHA, 2001).

O selênio é um micronutriente essencial que apresenta um intervalo muito estreito de concentrações entre a sua deficiência e excesso (Suzuki and Ogra, 2001). A ingestão excessiva de Se conduz à manifestação de efeitos tóxicos designados pelo termo selenose. Os sintomas incluem cabelo danificado e quebradiço, hálito com odor forte (como a alho), erupções cutâneas, unhas fragilizadas com linhas de descoloração e possivelmente paroníquia, uma infecção da pele em torno das unhas, cáries dentárias, fadiga, irritabilidade, tremor e lesões no sistema nervoso (Reid et al., 2004). O mecanismo segundo o qual o Se induz toxicidade ainda não se encontra devidamente esclarecido mas é usualmente atribuído à sua capacidade de causar *stress* oxidativo (Valdiglesias et al., 2010). Já uma ingestão deficiente de selênio resulta noutros tipos de problemas de saúde, tais como a doença de Keshan, um tipo de cardiomiopatia, e a síndrome de Kashin-Beck, uma forma de artrite, que foram pela primeira vez identificados numa região da China com solos particularmente pobres em selênio (Venardos et al., 2004). São várias as funções biológicas que se encontram associadas a este elemento tais como a regulação do sistema imunitário e endócrino, moderação da resposta inflamatória, modulação do humor e prevenção de doenças cardiovasculares e oncológicas (Rayman, 2000).

Atualmente, os valores de ingestão de Se recomendados para a população humana encontram-se entre 55 e 75 $\mu\text{g}/\text{dia}$ mas as propriedades anticancerígenas associadas a este elemento ocorrerão apenas a níveis de ingestão na ordem dos 200 $\mu\text{g}/\text{dia}$ (Beckett and Arthur, 2005). Os estudos efetuados sobre este efeito protetor do Se relativamente ao desenvolvimento de doenças cancerígenas têm revelado resultados contraditórios, com alguns

a apoiar esta propriedade do selênio (Combs and Gray, 1998; Yu et al., 1997) e outros não (Dunn et al., 2010).

A dieta trata-se da principal fonte pela qual os humanos obtêm selênio e, portanto, o nível de ingestão deste elemento depende da sua concentração nos alimentos e da quantidade de alimentos ricos em selênio que são consumidos (Valdiglesias et al., 2010). Tanto as formas inorgânicas como as formas orgânicas de selênio podem ser obtidas por via nutricional. O selenito e o selenato são as formas inorgânicas, enquanto que a selenocisteína (SeC) e a selenometionina (SeMet) se tratam das formas orgânicas mais comuns – Figura 6 (Suzuki and Ogra, 2001). A noz do Brasil e as vísceras como, por exemplo, rins são fontes nutricionais ricas em selênio tal como o marisco, peixe, fígado e carne aviária também são fontes importantes. Na América do Norte, o trigo trata-se de uma boa fonte nutricional de selênio mas o mesmo não se passa na Europa devido à baixa disponibilidade deste elemento na maioria dos solos do continente. Ainda assim, uma alimentação que inclui pão e cereais contribui para o aporte de selênio (Rayman, 2000). A quantidade de selênio presente nos alimentos é normalmente suficiente para evitar a necessidade de suplementação mas as importantes funções biológicas e o efeito protetor da saúde desempenhados por este elemento conduziram a que várias pessoas consumam suplementos de selênio regularmente (Valdiglesias et al., 2010; MacFarquhar et al., 2010). A utilização deste tipo de suplementos que normalmente vêm na forma de comprimidos com quantidades de Se até 200 µg é considerável em vários países e parece estar a aumentar mas a ocorrência de algumas intoxicações agudas e subagudas fizeram com que a sua utilização fosse restringida em alguns países, como é o caso da Austrália (Tingii, 2003; Valdiglesias et al., 2010).

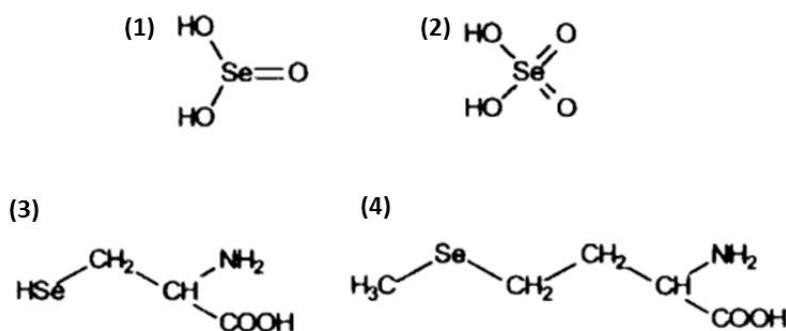


Figura 6 – Estrutura química dos compostos inorgânicos e orgânicos de selênio: (1) selenito; (2) selenato; (3) selenocisteína; (4) selenometionina (adaptado de Suzuki and Ogra, 2001).

O selênio pode atuar como cofator de algumas proteínas mas a sua função biológica mais importante reside na sua integração na forma de SeC em proteínas chamadas de selenoproteínas (Papp et al, 2007). Nas plantas, as formas inorgânicas de Se são transformadas em compostos orgânicos como a SeMet, SeC e outros derivados metilados. Ao serem ingeridas pelos animais, os compostos de selênio que continham vão experimentar novas alterações. Assim, o selenito e o selenato são reduzidos pela glutathione enquanto que a SeMet e a SeC são reduzidas pela β -liase (Suzuki and Ogra, 2001). No final de qualquer um destes processos forma-se Se^{2-} , que é excretado após metilação ou utilizado na síntese de SeC, atualmente considerada o 21º aminoácido, e que é incorporada em selenoproteínas (Papp et al, 2007; Suzuki and Ogra, 2001). O selênio pode ainda ser incorporado noutros tipos de proteínas na forma de SeMet, que não é discriminada da metionina. Nestes casos, a SeMet na sua forma intacta é incorporada em proteínas de acordo com o mesmo codão e tRNA destinados à metionina. Como tal, a SeMet obtida através da dieta pode ser utilizada como uma fonte de selênio para a síntese das selenoproteínas após a sua metabolização à forma de selenito ou então pode ser usada na sua forma intacta na síntese de outros tipos de proteínas (Suzuki and Ogra, 2001). Esta forma orgânica, ao contrário dos outros compostos de selênio, é assim metabolicamente reciclada, apresentando uma taxa de *turnover* mais lenta e servindo de reservatório de Se no organismo (Combs and Gray, 1998).

Ao contrário daquilo que acontece com outros aminoácidos, a SeC tem de ser primeiramente degradada à forma de Se^{2-} para que o último possa então ser usado na síntese da SeC que vai ser incorporada nas selenoproteínas (Hatfield et al., 2006). A SeC é integrada nas proteínas segundo um processo regulado no qual está envolvida a sequência de inserção da selenocisteína (SECIS) e o *misreading* do codão UGA de modo a que ocorra a inserção da SeC ao invés da leitura do sinal de STOP normalmente associado a este codão (Venardos et al., 2004). O genoma humano apresenta 25 genes que codificam a síntese das selenoproteínas (Papp et al., 2007).

Várias selenoproteínas apresentam o resíduo de SeC no grupo catalítico do seu centro ativo, que está diretamente envolvido em reações redox. Assim, do ponto de vista celular, as selenoproteínas são necessárias para vários processos, tais como biossíntese de desoxirribonucleotídeos (dNTPs) para o DNA, remoção de peróxidos, redução de proteínas e membranas oxidadas, regulação do sinal redox, metabolismo da hormona tiroide, transporte e armazenamento de selênio e *folding* proteico. Tendo em conta a localização do resíduo de SeC, as selenoproteínas podem ser divididas em dois grupos (Figura 7). Um destes, que inclui, por exemplo, a tiorredoxina redutase (TrxR), abrange as proteínas cujo resíduo de SeC se

encontra no terminal-C. O segundo grupo é composto por proteínas cujo resíduo de SeC está localizado no terminal-N, entre uma folha β e hélice α como parte do motivo selenilsulfureto/selenoltiol com ação redox (Papp et al., 2007). A pH 7,4, o grupo tiol (-SH) dos resíduos de cisteína encontra-se principalmente presente na sua forma neutra (pKa 8,7) enquanto que os grupos selenol (-SeH) nos resíduos de SeC, por apresentarem um pKa mais baixo (5,2), se encontram predominantemente ionizados na forma de selenolato (-Se⁻). Assim, a reatividade dos resíduos de SeC é superior à dos resíduos de Cys, o que se traduz na grande capacidade catalítica das selenoenzimas (Rahmanto and Davies, 2012).

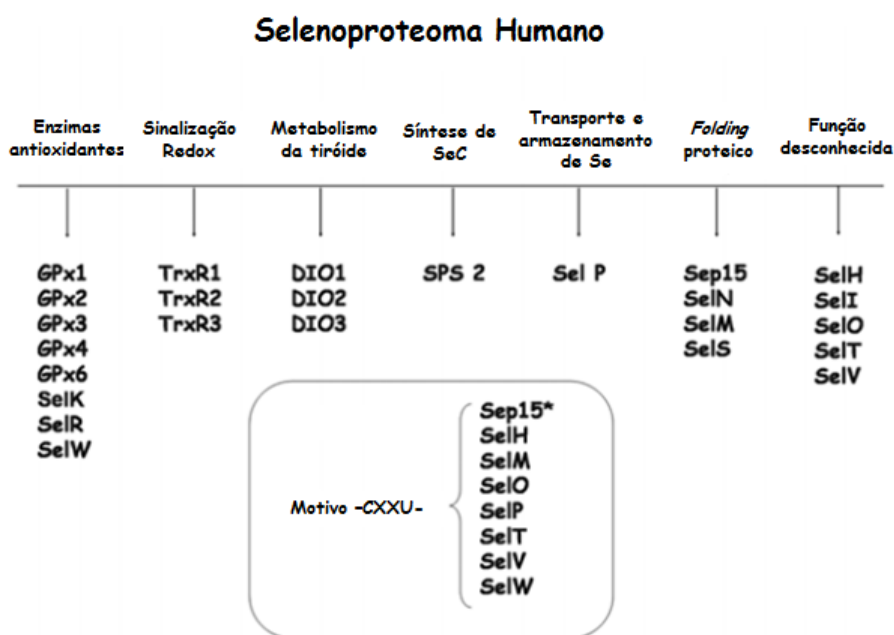


Figura 7 – O selenoproteoma humano. As selenoproteínas que apresentam o motivo -CXXU- (resíduos de Cys e de SeC separados por dois outros aminoácidos) são mostradas na caixa. *A Sep15 apresenta um motivo -CXU- (adaptado de Papp et al., 2007).

A síntese das selenoproteínas ocorre segundo uma hierarquia que tem em consideração a importância biológica relativa de cada uma delas, sendo que a TrxR se encontra no topo desta (Flohé and Brigelius-Flohé, 2006). Para além disso, o cérebro trata-se de um órgão prioritário para a distribuição do selénio, observando-se que o córtex cerebral, hipocampo, cerebelo e bulbo olfatório expressam o número mais elevado de selenoproteínas (Ralston and Raymond, 2010).

Uma selenoproteína de grande importância trata-se da selenoproteína P (SelP), que é a principal selenoproteína no plasma, onde representa cerca de 50% do selénio presente. Ao contrário daquilo que acontece com a maioria das outras selenoproteínas, que apenas

apresentam um único resíduo de SeC por cadeia polipeptídica, a SelP apresenta 10 resíduos de SeC por molécula, estando dois envolvidos nas pontes de selenilsulfureto com os resíduos de Cys (Ralston and Raymond, 2010). Esta trata-se então de uma glicoproteína com uma massa molecular de aproximadamente 57 kDa que é principalmente excretada pelo fígado, onde o seu tempo de *turnover* é rápido, para o plasma, sendo depois distribuída pelo organismo (Burk and Hill, 2009; Gailer et al., 2000). Trata-se de um marcador dos níveis nutricionais de selénio uma vez que a sua concentração no plasma diminui significativamente (menos de 5%) quando a deficiência em Se aumenta (Burk and Hill, 2009). As suas principais funções parecem estar associadas com o armazenamento e transporte de selénio, assegurando principalmente a última no que toca ao cérebro (Papp et al., 2007; Ralston and Raymond, 2010).

2.2. Interação mercúrio - selénio

Uma das primeiras experiências que demonstrou o efeito protetor do selénio na toxicidade do mercúrio foi efetuada por Parizek e Ostadalova (1967) usando ratos. Demonstraram que na presença de selenito de sódio (Na_2SeO_3), os rins dos ratos eram protegidos da ação tóxica do cloreto de mercúrio (HgCl_2). Estes rins não apresentavam alterações macroscópicas nem danos histológicos, em contraste com o observado nos rins de ratos tratados apenas com HgCl_2 . Apesar de alguns autores terem observado o mesmo tipo de efeito nas suas experiências (Cuvin-Aralar and Furness, 1988; Kosta et al., 1975), esse não foi o caso para outros (Choi et al., 2008; Saint-Amour et al., 2006). Alguns trabalhos também demonstraram que a razão pela qual a interação Hg-Se nem sempre é benéfica poderá estar relacionada com a depleção de Se disponível no organismo (Yang et al., 2008). Assim, apesar da relação entre o selénio e o mercúrio normalmente ser antagónica, os efeitos aditivos ou sinérgicos também podem ser observados, o que será de se esperar se se tiver em consideração que o selénio exerce efeitos tóxicos quando presente em concentrações elevadas. Como tal, o resultado final desta interação irá depender das concentrações relativas de Se e de Hg, as suas biodisponibilidades e a sensibilidade do animal ou do órgão específico (Khan and Wang, 2009).

Após a realização dos primeiros trabalhos de interação entre Na_2SeO_3 e HgCl_2 por Parizek e Ostadalova referidos acima, os estudos foram continuados no sentido de se esclarecer o mecanismo subjacente a esta interação. O selenito, após ser reduzido a seleneto (Se^{2-}) nos eritrócitos, reage com o Hg^{2+} presente na corrente sanguínea, formando-se o complexo equimolar $(\text{Hg-Se})_n$, que se liga então a uma proteína específica do plasma que foi

proposta ser a Selp (Yoneda and Suzuki, 1997). A co-administração de selenito e de mercúrio inorgânico é de grande importância uma vez que, na ausência de Hg^{2+} , o seleneto é seletivamente sequestrado pela albumina e, para além disso, o atraso na administração de Na_2SeO_3 parece não produzir um efeito protetor (Nagamuna et al., 1984; Sasakura and Suzuki, 1998). Esta reação encontra-se representada na Figura 8. A ligação que ocorre entre Hg, Se e Selp estabelece-se graças a interações iónicas entre o complexo Hg-Se e os centros catiónicos compostos por grupos imidazolil nos resíduos histidinil da Selp (Suzuki et al., 1998). Foi já demonstrado que após a exposição a mercúrio inorgânico, as concentrações de selénio e de mercúrio no cérebro apresentam uma razão molar de 1:1 e também foram detetados grânulos insolúveis de HgSe no fígado e nos rins de animais aos quais se administrou Hg inorgânico e Se simultaneamente (Khan and Wang, 2009).

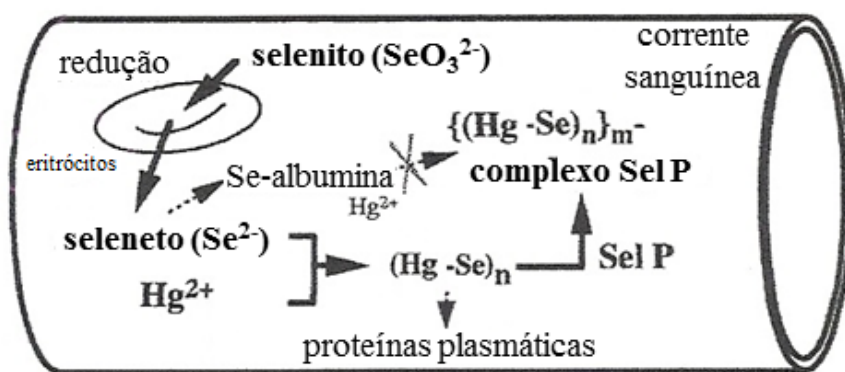
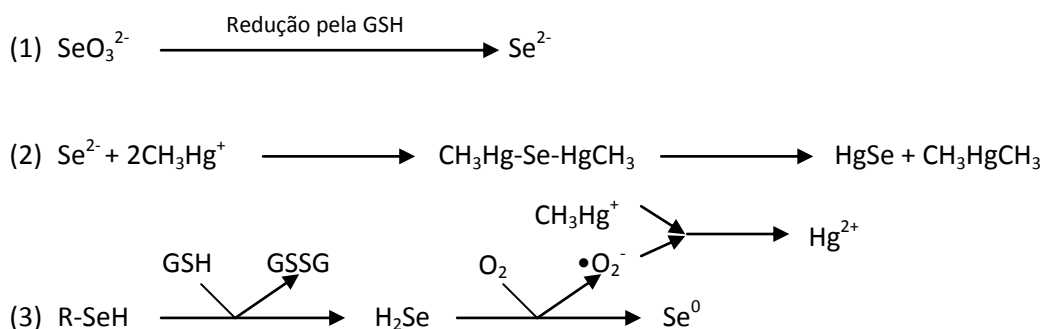


Figura 8 – Mecanismo proposto para a formação do complexo (Hg-Se)-Selp na corrente sanguínea. O seleneto e os íões Hg^{2+} formam o complexo $(\text{Hg-Se})_n$ que, em seguida, se une seletivamente aos sítios de ligação (m) na Selp para formar o complexo $[(\text{Hg-Se})_n]_m\text{-Selp}$ (adaptado de Sasakura and Suzuki, 1998).

Existem também várias evidências do efeito protetor do selénio contra a toxicidade do MeHg, apesar dos mecanismos segundo os quais tal ocorre ainda não se encontrarem devidamente esclarecidos (Yang et al., 2008). Foi demonstrado que o selénio nutricionalmente adquirido tem a capacidade de aliviar os sintomas tóxicos desencadeados pela exposição ao MeHg (Ganther et al., 1972; Ralston et al., 2008), tendo sido capaz de atrasar sintomas neurológicos, melhorar o ganho de peso e reduzir a mortalidade (Yang et al., 2008). São vários os mecanismos propostos segundo os quais se pretende explicar estes efeitos. A abundância de grupos sulfidriilo nas biomoléculas e a grande afinidade do MeHg para com estes permite a formação de complexos MeHg-Se-R. Esta trata-se de uma ligação altamente lábil e, portanto, o MeHg pode alterar rapidamente o seu ligando (R) tanto em soluções aquosas como em

sistemas biológicos. Vários compostos de MeHg-Se foram propostos na literatura incluindo o seleneto bis-metilmercúrio $[(CH_3Hg)_2Se]$ e MeHg-SeC, que são pouco biodisponíveis (Khan and Wang, 2009). O selênio também poderá estar ativamente envolvido na desmetilação do MeHg existindo a hipótese de que este processo ocorra segundo as seguintes reações (Yang et al., 2008):



O efeito protetor do Se relativamente à toxicidade do MeHg poderá ainda estar relacionado com a inibição dos radicais metilo gerados pelo composto mercurial. O selênio faz parte da enzima GPx que atua decompondo peróxidos que, de outro modo, iriam iniciar a quebra do MeHg (Khan and Wang, 2009). No entanto, o efeito protetor do Se ainda não se encontra firmemente estabelecido uma vez que também desempenha um papel importante na redistribuição do MeHg no organismo, observando-se que a interação entre Se e Hg resulta num aumento da concentração do último no fígado, baço e cérebro, podendo exercer toxicidade (Magos and Webb, 1977; Cuvin-Aralar and Furness, 1991).

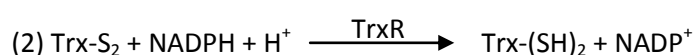
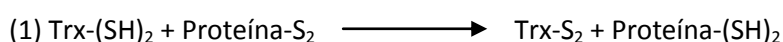
Como foi mencionado acima, o mercúrio apresenta uma maior afinidade para a ligação a grupos selenol do que a grupos tiol, existindo uma maior reatividade entre os dois (Carvalho et al., 2008b). Esta elevada afinidade entre Hg e Se resulta na ligação entre os dois, o que pode comprometer as funções e disponibilidade biológicas do selênio. Bioquimicamente, o mercúrio trata-se de um inibidor irreversível das selenoenzimas pois a sua elevada afinidade para com o Se permite que o sequestre especificamente nos centros ativos de enzimas essenciais dependentes deste elemento. Como tal, a atividade das selenoenzimas é inibida e observa-se também a formação de compostos insolúveis, como os que já foram referidos. Tal resulta na depleção do selênio disponível para participar nos ciclos subsequentes de síntese de selenoproteínas. Tendo em consideração que as selenoenzimas são vitais para o controlo redox bem como para a prevenção e reversão dos danos oxidativos causados pelo mercúrio nos tecidos, a perda destas enzimas resulta em efeitos adversos e poderá mesmo culminar em morte. Como tal, uma fonte exógena de selênio, tal como a dieta, é de grande importância

uma vez que o selênio adicional garante níveis adequados deste elemento que permitem substituir o Se perdido na ligação com o Hg, possibilitando a síntese normal de selenoproteínas e revertendo os efeitos adversos que possam ocorrer na ausência destas (Ralston and Raymond, 2010).

3. Introdução ao estudo do sistema da tiorredoxina

As espécies reativas de oxigénio são geradas e degradadas por todos os organismos aeróbios, conduzindo a uma concentração fisiológica necessária para o funcionamento normal da célula ou, pelo contrário, quando presentes em quantidades excessivas, a um estado celular chamado de *stress* oxidativo (Nordberg and Arnér, 2001). O ambiente redox celular, considerando os seus aspetos metabólicos, antioxidantes e reguladores, é principalmente mantido e regulado por dois sistemas - o sistema da glutatona e o sistema de tiorredoxina (Trx). Em ambos, estão envolvidas flavoenzimas dependentes de NADPH, designadamente a glutatona redutase (EC 1.8.1.7) e a tiorredoxina redutase (EC 1.8.1.9) (Gromer et al., 2004). Estes dois sistemas não se encontram em equilíbrio entre si e tal possibilita que sejam utilizados para regular diferentes aspetos das funções celulares (Hansen et al., 2006a). Assim, apesar da Trx se encontrar presente nas células em níveis substancialmente mais baixos que a GSH, o seu papel na regulação de eventos celulares parece ser mais direto, fazendo com que se trate de um potencial alvo crítico para substâncias tóxicas (Watson et al., 2004).

O sistema da tiorredoxina é constituído pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH e o seu mecanismo base, que se encontra associado à sua função principal, consiste no fornecimento de eletrões aos grupos dissulfureto das proteínas de modo a garantir a manutenção destas na forma reduzida no ambiente intracelular. Assim, após a ligação não covalente da superfície hidrofóbica junto ao centro ativo da Trx com o grupo dissulfureto da proteína alvo, o último vai sofrer um ataque nucleofílico por parte do grupo tiolato exposto no centro ativo do terminal-N da Trx. Esta reação conduz à formação transitória de um composto intermediário que é depois reduzido pelo grupo tiolato do terminal-C, possibilitando a redução do grupo dissulfureto da proteína alvo, o que é acompanhado pela oxidação do centro ativo da Trx – reação 1. A última é reduzida pelo NADPH numa reação catalisada pela TrxR – reação 2. Esta reação de troca tiol - dissulfureto é reversível (Hashemy, 2011).



Adicionalmente, o sistema da tiorredoxina encontra-se implicado num elevado número de funções biológicas tais como a síntese de DNA e proliferação celular, angiogénese, controlo e regulação da atividade de vários fatores de transcrição, proteção celular contra a apoptose e

vias de sinalização celular através da interação com outras proteínas (Lillig and Holmgren, 2007). Como tal, a intervenção deste sistema numa tão grande variedade de funções biológicas demonstra a sua importância vital. Tal é também refletido no facto da Trx estar presente em todas as células vivas e apresentar uma longa história evolutiva em paralelo com o DNA enquanto material genético, no desenvolvimento do metabolismo do oxigénio, na defesa contra o *stress* oxidativo e na emergência de funções fisiológicas mais complexas, incluindo o uso de sinalização redox com oxidantes como o H_2O_2 e o NO (Holmgren and Lu, 2010).

3.1. Tiorredoxina (Trx)

A superfamília da tiorredoxina engloba várias proteínas, entre as quais tiorredoxinas, glutarredoxinas, glutathione transferases ou glutathione peroxidases, sendo que todas estas são caracterizadas pela presença de um motivo estrutural comum chamado de *fold* da tiorredoxina. O último consiste em quatro folhas β pragueadas rodeadas por três hélices α com o motivo -Cys-X-X-Cys- no centro ativo conservado. No caso da tiorredoxina, esta apresenta também uma folha β pragueada e hélice α extras no terminal-N (Lillig et al., 2007). O elevado nível de estruturas secundárias poderá explicar a estabilidade significativa da Trx, por exemplo, ao calor, embora existam algumas exceções (Gromer et al., 2004). Assim, a tiorredoxina é uma proteína pequena ubiquamente presente nos vários tecidos e espécies. Apesar disso, o seu centro ativo (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-) encontra-se altamente conservado entre espécies e observa-se que todos os grupos filogenéticos desde Archea até aos humanos apresentam esta proteína com a mesma estrutura tridimensional geral (Arnér and Holmgren, 2000; Hashemy, 2011).

A Trx existe segundo diferentes formas, tendo sido descritas duas isoformas nos mamíferos. A Trx1 (Figura 9) é uma proteína de 12 kDa que existe predominantemente no citosol, apesar de também poder ser encontrada no núcleo (Watson et al., 2004). O mecanismo pelo qual esta translocação ocorre é ainda desconhecido mas observa-se tanto em células normais como em células tumorais e deverá advir de situações de *stress* oxidativo aumentado (Hansen et al., 2006b; Hashemy, 2011). Esta isoforma de Trx apresenta três resíduos adicionais de Cys fora do centro ativo (Cys62, Cys69 e Cys73) que se pensa estarem envolvidos na regulação da atividade da Trx1 (Lillig and Holmgren, 2007). A Trx1 também pode ser secretada de células como os hepatócitos, fibroblastos, linfócitos e monócitos ativos e ser encontrada a nível extracelular na sua forma normal ou numa forma truncada mais pequena

chamada de Trx80 (Arnér and Holmgren, 2006; Hashemy, 2011). O mecanismo segundo o qual esta excreção ocorre é desconhecido mas pensa-se estar relacionado com condições oxidativas e de inflamação. A Trx1 secretada encontra-se envolvida numa variedade de funções fisiológicas e patofisiológicas, podendo atuar como uma co-citocina e quimiocina nas células imunitárias, estimulando o crescimento dos linfócitos, ou como um fator de crescimento autócrino para fibroblastos normais e várias linhas de células tumorais (Hashemy, 2011). Para além disso, a Trx1 extracelular também pode exercer efeitos pró-inflamatórios ao potenciar a libertação de citocinas dos fibroblastos e dos monócitos e atuar como uma proteína quimiotática, causando a migração de neutrófilos, monócitos e células T com uma potência similar à da interleucina IL-8. Apesar disto, a Trx1 nestas condições pode também bloquear a ação de outras quimiocinas e, portanto, se os seus níveis forem elevados durante uma inflamação, esta será mais severa pelo bloqueio da migração das células (Arnér and Holmgren, 2000). Por sua vez, a Trx80, localizada na superfície dos monócitos, está presente no plasma humano, ajudando a melhorar a atividade citotóxica dos eosinófilos e apresentando também atividade quimiotática para os monócitos e neutrófilos polimorfonucleados. No entanto, não se trata de um substrato para a TrxR e não apresenta atividade de oxidoreductase como a Trx1, apesar de possuir o mesmo centro ativo conservado (Hashemy, 2011).

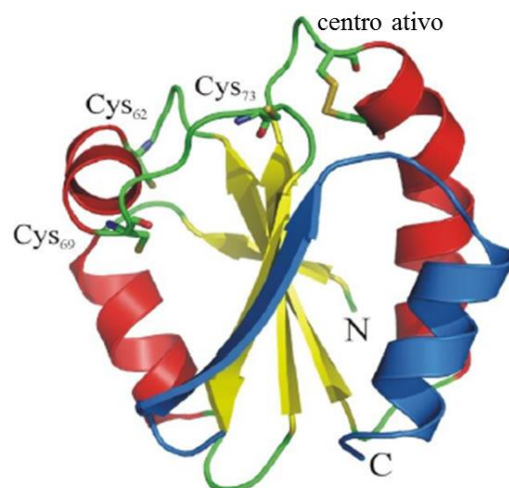


Figura 9 – Estrutura da Trx1 humana indicando a posição do centro ativo e dos três resíduos estruturais (Cys62, Cys69 e Cys73) (adaptado de Lillig and Holmgren, 2007).

A outra proteína Trx encontrada nos mamíferos trata-se da Trx2 (12,2 kDa), presente nas mitocôndrias (Watson et al., 2004). A Trx2 não apresenta os resíduos estruturais de Cys que são observados na Trx1, mas possui o mesmo centro ativo conservado presente na última

e, adicionalmente, uma elongação do terminal-N envolvida no seu *uptake* mitocondrial (Smeets, et al., 2005; Watson et al., 2004).

Finalmente, para além das duas isoformas de Trx previamente mencionadas, também existem outras proteínas da família da tioredoxina específicas de alguns tecidos e/ ou organelos tais como as Trx específicas do espermátócito/ espermátide (SpTrxs), a Tx1-1, semelhante à Trx1, e a nucleoredoxina Nr1 que, apesar de apresentarem o motivo -Cys-X-X-Cys- do centro ativo conservado da Trx, não têm atividade de oxidoreductase (Lillig and Holmgren, 2007).

3.2. Tiorredoxina redutase (TrxR)

A tioredoxina redutase é uma flavoenzima homodimérica que pertence à família das piridinas nucleotídeo-dissulfureto oxidoreductases, que inclui ainda outras enzimas tais como a lipoamida desidrogenase, a glutathione redutase, a tripanotiona redutase e a mercúrio redutase (Zhong et al., 1998; Zhong et al., 2000). Do ponto de vista estrutural, a TrxR dos mamíferos apresenta o seu centro ativo no terminal-N, um domínio FAD, regiões de ligação ao NADPH e resíduos preservados importantes para a sua atividade catalítica. O seu centro ativo dissulfureto/ditiol (-Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys-) é o mesmo presente na glutathione redutase mas a TrxR, contrariamente à última enzima, apresenta ainda na sua estrutura uma elongação contendo um terminal-COOH com um resíduo de SeC na sequência conservada -Gly-Cys-SeC-Gly-COOH (Figura 10) (Zhong et al., 1998). Esta sequência inclui um grupo selenilsulfureto/ selenoltiol (Cys497-SeC498) e o penúltimo resíduo de SeC na elongação de 16 resíduos no terminal-COOH é indispensável à atividade desta selenoenzima (Papp et al., 2007; Zhong et al., 2000).

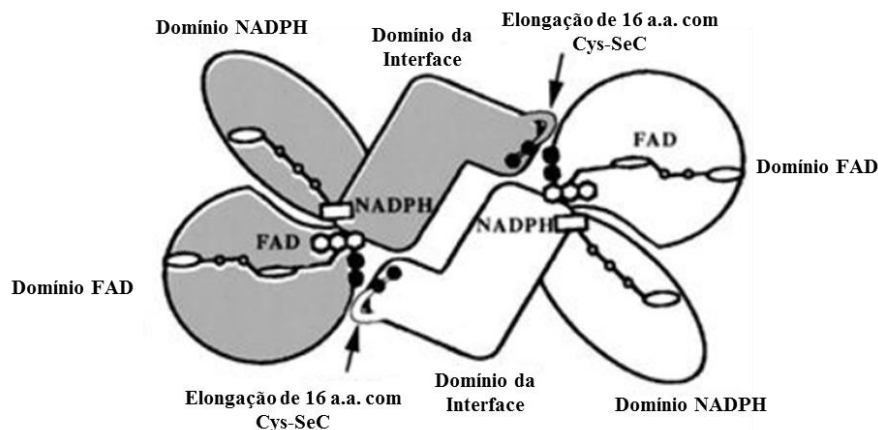


Figura 10 – Modelo estrutural da TrxR de mamífero onde os pontos • nos domínios FAD representam o grupo dissulfureto/ditio do terminal-N e os pontos • nos domínios da interface representam o grupo selenilsulfureto/selenoltio da elongação do terminal-COOH (adaptado de Zhong et al., 2000).

A elongação no terminal-COOH poderá explicar a ampla especificidade de substratos apresentados pela TrxR dos mamíferos, ao contrário do que acontece no caso da glutatona redutase e da lipoamida desidrogenase, uma vez que o grupo Cys-SeC no terminal-COOH é altamente acessível quando a TrxR se encontra reduzida (Zhong et al., 1998). Para além disso, o baixo pKa do grupo selenol permite a ionização deste em condições de pH fisiológico, originando-se o ião selenolato, que é altamente reativo e um forte nucleófilo, tornando a TrxR num alvo para compostos electrofílicos (Anestål et al., 2008; Papp et al., 2007).

A tiorredoxina redutase trata-se da única enzima com capacidade para reduzir a tiorredoxina oxidada e, como tal, uma diminuição na atividade celular da TrxR iria conduzir a uma redução nos eletrões transferidos do NADPH para a Trx, acompanhado de alterações no potencial redox da célula graças à deficiência de selénio (Lu et al., 2009). A TrxR dos mamíferos pode ainda reduzir outros substratos como tiorredoxinas de espécies diferentes, vários compostos de baixo peso molecular, tais como o reagente de Ellman (DTNB; ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzóico)) e o ácido lipoico, e ainda compostos sem grupos dissulfureto, como selenodiglutationa, selenito, aloxano ou hidroperóxidos lipídicos (Zhong et al., 1998).

Existem três isoformas humanas de TrxR: TrxR1 (54,4 kDa), que ocorre no citosol, TrxR2 (56,2 kDa), que está presente nas mitocôndrias, e a TGR (65 kDa), encontrada nos testículos (Mukherjee and Martin, 2008; Su et al., 2005). Todas estas enzimas apresentam conservadas as características estruturais previamente mencionadas (Chew et al., 2008). No entanto, relativamente à TrxR1, a TrxR2 apresenta uma sequência adicional de 33 aminoácidos no terminal-N que funciona como sequência alvo mitocondrial (Miranda-Vizuet et al., 1999). A TrxR1 e a TrxR2 reduzem, respetivamente, a Trx1 e a Trx2 (Cheng et al., 2010). A estrutura da

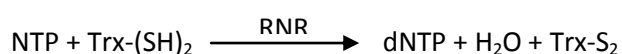
TGR é também ligeiramente diferente da TrxR1 uma vez que, em comparação com a última, apresenta um domínio adicional no terminal-N semelhante à glutaredoxina, o que permite que, do ponto de vista enzimático, possa atuar como tiorredoxina redutase, glutathione redutase ou glutaredoxina em ensaios *in vitro* (Su et al., 2005). A TGR encontra-se envolvida na maturação do esperma através da formação de ligações dissulfureto que promovem a formação de componentes estruturais deste (Su et al., 2005).

3.3. Funções biológicas do sistema da tiorredoxina

O sistema da tiorredoxina encontra-se a montante de processos celulares vitais para a homeostase das células e do organismo e, como tal, a inibição desta via pode originar vários efeitos a jusante (Mukherjee and Martin, 2008). De facto, a inibição da TrxR conduz à subsequente manutenção da Trx no estado oxidado, o que, por sua vez, resulta numa modificação significativa nas atividades de proteínas que lhe estão associadas. Como tal, pode-se concluir que a inibição da TrxR conduz à inibição do sistema da tiorredoxina no seu todo (Lu et al., 2007).

De facto, o elevado número de atividades identificadas para a tiorredoxina sugere claramente que esta se trata de um alvo molecular crítico para a viabilidade celular (Watson et al., 2004). As células necessitam de manter um ambiente intracelular no estado reduzido mas a emergência evolutiva do oxigénio molecular (O_2) veio ameaçar esta condição essencial, uma vez que deste podem originar-se ROS que ameaçam a integridade celular pela oxidação dos seus constituintes. Para evitar que tal aconteça, as células desenvolveram sistemas que permitem reduzir as concentrações de ROS e diminuir o *stress* oxidativo (Gromer et al., 2004). Tal pode acontecer através da redução direta do H_2O_2 e hidroperóxidos lipídicos pela TrxR, que é um mecanismo especialmente relevante em situações que envolvam níveis elevados de peróxidos (Zhong et al., 2000). No entanto, a função mais importante desempenhada pelo sistema da tiorredoxina na defesa celular contra o *stress* oxidativo consiste na transferência de eletrões à família das peroxirredoxinas, constituída por pelo menos 6 isoformas ubiquamente expressas nas células dos mamíferos, sendo responsáveis pela redução do H_2O_2 (Arner and Holmgren, 2000). Para além disso, o sistema da tiorredoxina também tem a capacidade de regenerar proteínas inativadas pelo *stress* oxidativo (Gromer et al., 2004). O sistema da tiorredoxina, complementado com o sistema da glutathione, mantém o ambiente intracelular da célula no estado reduzido ao reduzir os grupos dissulfureto das proteínas, mesmo sob condições de *stress* oxidativo severas, conseguindo assim mediar a resposta celular a

alterações no seu potencial redox. Intervém também na regulação redox de moléculas sinalizadoras e de fatores de transcrição, incluindo NF-κB, Ref-1, AP-1, p53, HIF-1α, recetor glucocorticóide e a cinase 1 reguladora do sinal de apoptose (ASK1), podendo-se concluir que este sistema desempenha um papel vital na proliferação e morte celulares bem como na ativação da resposta imune (Lillig and Holmgren, 2007; Lu et al., 2009). A tiorredoxina na forma reduzida pode inibir a apoptose ligando-se à ASK1 quando os níveis de *stress* oxidativo são baixos mas a apoptose é ativada quando a Trx é oxidada, o que encaixa na noção geral de que o *stress* oxidativo aumentado faz parte do mecanismo de indução da apoptose (Arnér and Holmgren, 2000; Chew et al., 2008). Apesar do seu envolvimento na resistência à apoptose, a indução desta desencadeada pelo supressor tumoral p53 parece implicar a participação do sistema da tiorredoxina intacto de modo a melhorar a sua capacidade de ligação ao DNA (Arnér and Holmgren, 2006; Gromer et al., 2004). Todas as células que se multiplicam necessitam de preparar cópias idênticas do seu DNA, tratando-se esta de uma tarefa que necessita de desoxirribonucleotídeos. Os últimos são obtidos pela redução dos ribonucleotídeos (NTPs) correspondentes numa reação catalisada pela ribonucleotídeo redutase (RNR), da qual a Trx se trata da principal dadora de hidrogénios, segundo a reação:



Foi esta reação que conduziu à descoberta da tiorredoxina (Gromer et al., 2004). É pouco provável que qualquer uma das propriedades biológicas da Trx seja ‘boa’ ou ‘má’ no desenvolvimento de doenças específicas uma vez que o efeito desta proteína dependerá do tipo e da fase em que a condição se encontra. Como tal, no caso do cancro, as propriedades antiapoptóticas da Trx são consideradas nefastas uma vez que podem prejudicar a eficácia dos tratamentos de quimioterapia que pretendem desencadear a apoptose. No entanto, no caso das lesões por isquemia-reperfusão, nas quais a apoptose contribui para a patologia, a Trx pode ter um efeito protetor. Da mesma forma, os efeitos da Trx que promovem o crescimento são nefastos no cancro e na artrite reumatoide mas benéficos em doenças neurodegenerativas nas quais a promoção do crescimento neuronal ajuda na recuperação. No caso das infeções com HIV, a Trx bloqueia a replicação do vírus mas, numa fase mais avançada da doença, contribui para a imunossupressão em alguns pacientes (Burke-Gaffney et al., 2005). Assim, dado o envolvimento do sistema da tiorredoxina na patogénese de um número substancial de doenças é importante considerar-se também o seu efeito em drogas clinicamente usadas, que

tanto podem ser reduzidas por este sistema como inibidas por ele (Arnér and Holmgren, 2000).

3.4. Interação entre o sistema da tioredoxina e compostos electrofílicos

A inibição do sistema da tioredoxina pode ser causada por diversos compostos. A TrxR é mais vulnerável à inibição por interação com compostos electrofílicos pois, como já foi previamente mencionado, o grupo selenol acessível no centro ativo do terminal-C torna-a mais suscetível à inibição por este tipo de agentes (Arnér, 2009). Tendo em consideração que os constituintes do sistema da tioredoxina se encontram normalmente sobre-expressos nos tumores, esta característica da TrxR tem sido explorada no desenvolvimento de terapias anti-tumorais que têm como alvo o seu resíduo de SeC (Chew et al., 2008). No entanto, em contraste com o seu papel antioxidante, é relevante considerar-se que a inibição do centro ativo da TrxR poderá promover efeitos pró-oxidantes nas células, quando o seu resíduo de SeC é comprometido e a enzima é convertida num potente agente citotóxico, podendo causar diretamente a morte celular (Cheng et al., 2010). Foi demonstrado que quando um agente electrofílico tem como alvo o resíduo de SeC no terminal-C mas não o grupo ditiol no terminal-N, é gerada uma forma de TrxR selénio-comprometida sem a capacidade de reduzir a Trx mas que mantém a atividade de NADPH oxidase. Estas formas alteradas são chamadas de SecTRAPs – proteínas apoptóticas derivadas de TrxR com SeC alterada ou comprometida. A morte celular induzida pelas SecTRAPs envolve aspetos apoptóticos e necróticos bem como o aumento da produção intracelular de ROS (Anestâl et al., 2008).

Os metais, como o cádmio, o crómio, o mercúrio e o arsénio, podem interferir com o sistema da tioredoxina, tendo-se observado que têm a capacidade de inibir tanto a Trx como a TrxR (Carvalho et al., 2008b; Hansen et al., 2006a; Lemaire et al., 1999; Lu et al., 2007; Meyers, 2012). No caso dos compostos mercuriais, estudos *in vitro* demonstraram que estes provocam uma inibição dose-dependente da TrxR purificada observável após apenas 5 minutos de incubação, o que aponta para a elevada suscetibilidade desta selenoenzima a este tipo de agente electrofílico. Nestas condições, o Hg^{2+} demonstrou ser um inibidor mais potente da TrxR do que o MeHg (Carvalho et al., 2008b). Estudos estruturais demonstraram que o ditiol e o selenoltiol presentes no centro ativo da TrxR se tratam dos locais de ligação preferenciais dos compostos mercuriais, causando a perda da função catalítica da selenoenzima. Novamente, o Hg^{2+} demonstrou apresentar uma maior eficácia na ligação ao centro ativo da TrxR do que o MeHg. Apesar disso, o selenito na presença de NADPH, regenerou a atividade da

TrxR desativada pelo Hg^{2+} . Tal não aconteceu no caso da TrxR inibida pelo MeHg uma vez que o selenito de sódio não demonstrou ser capaz de prevenir o decaimento da atividade da enzima nestas condições. O mecanismo de recuperação da atividade da TrxR inibida pelo Hg^{2+} (Figura 11) envolve a conversão do selenito à forma de seleneto. O Hg^{2+} liga-se ao selenoltio no terminal-C da TrxR reduzida, inibindo a sua atividade mas o seleneto desaloja o Hg^{2+} do centro ativo, promovendo a formação de HgSe e regenerando o selenol da TrxR (Carvalho et al., 2011). A Trx também é suscetível à ação de metais *in vitro*, tendo sido demonstrado que o Hg^{2+} e o MeHg têm como alvo o grupo ditiol presente no centro ativo da Trx1 (Carvalho et al., 2008b). Lemaire et al. (1999) também demonstraram que o Hg^{2+} e o Cd^{2+} conseguem inibir a atividade da Trx-h purificada, que se trata de uma isoforma de Trx presente no citosol das células das plantas.

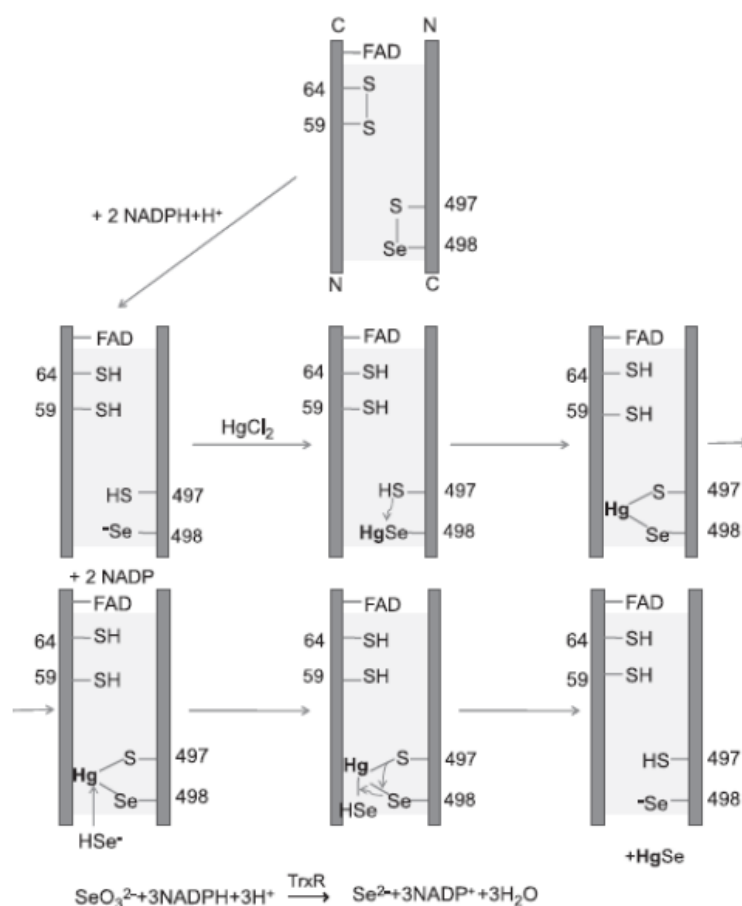


Figura 11 – Mecanismo proposto para a reativação da TrxR inibida pelo Hg^{2+} por ação do selenito de sódio (Carvalho et al., 2011).

A toxicidade dos metais no sistema da tiorredoxina também se faz sentir a nível celular. Tanto Talbot et al. (2008) como Lu et al. (2007) demonstraram que o tratamento com trióxido

de arsénio (ATO) conduz a uma diminuição da atividade da TrxR nas células A549 (adenocarcinoma pulmonar) e MCF-7 (cancro da mama), respetivamente. O MeHg e o Hg^{2+} também afetaram a atividade da TrxR e da Trx nas células HeLa e HEK 293 de uma forma dependente da concentração e do tempo. No entanto, a inibição da Trx não foi tão extensa como a da TrxR, cuja atividade nos lisados celulares se encontrava já fortemente inibida após 7h de exposição aos dois compostos de mercúrio (Carvalho et al., 2008b). Tal como foi observado *in vitro* com enzimas purificadas, o selenito de sódio conseguiu recuperar a atividade da TrxR nas células HEK 293 previamente expostas a Hg^{2+} (Carvalho et al., 2011). Os estudos realizados por Wagner et al. (2010) demonstraram que o MeHg consegue inibir com eficácia a atividade da TrxR nos rins e fígado de murganhos expostos, mas em menor extensão nos seus cérebros. Num estudo realizado com peixes, apesar de se ter observado que a inibição da TrxR pelo Hg^{2+} foi prevenida pelo selénio no fígado, o MeHg continuou a exercer efeitos tóxicos nas enzimas antioxidantes. Assim, a interação do selenito com o mercúrio *in vivo* depende do composto de Hg em causa bem como do órgão analisado (Branco et al, 2012).

No presente trabalho, o estudo da base molecular da interação entre compostos mercuriais e de selénio, bem como a relação destes com o sistema da tiorredoxina foi efetuado em células de neuroblastoma humano - células SH-SY5Y. Esta linha celular foi selecionada para os trabalhos experimentais pelo facto de serem células de um órgão alvo da toxicidade exercida pelo mercúrio. Assim, a utilização de uma linha celular do sistema nervoso central humano é vantajosa uma vez que este se trata de um modelo experimental mais próximo da situação de envenenamento humano por mercúrio, podendo-se assim recolher informações mais pertinentes. O trabalho experimental foi iniciado com estudos de viabilidade (ensaio do MTT) que permitiram definir a toxicidade relativa dos compostos testados para com as células SH-SY5Y. Tendo em consideração os resultados obtidos na etapa previamente indicada, a atividade experimental foi então prosseguida com a avaliação da relação dos compostos mercuriais com o sistema da tiorredoxina. Nesta fase do estudo dedicou-se ainda especial atenção aos efeitos da co-exposição de compostos de selénio na interação entre compostos mercuriais e a selenoenzima tiorredoxina redutase.

4. Objetivos

O mercúrio é um poluente à escala global sem função biológica conhecida e relativamente ao qual existe uma exposição muito significativa por parte da população humana. Como tal, do ponto de vista da saúde humana, o estudo da interação entre o mercúrio e o selénio é de grande relevância assim como o estudo da interação do mercúrio com selenoproteínas, presentes em todos os organismos vivos.

Como tal, o principal objetivo deste trabalho foi:

- Avaliar a ação protetora dos compostos de selénio como antagonistas da toxicidade do mercúrio, estudando os mecanismos de ação envolvidos a nível molecular e celular.

Para atingir este objetivo, foram realizados ensaios toxicológicos *in vitro* que permitiram avaliar os efeitos específicos causados pelo mercúrio e selénio nas células SH-SY5Y e, mais concretamente, no sistema da tioredoxina. Assim, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Realizar ensaios de viabilidade celular de modo a estabelecer o intervalo de concentrações efetivas de compostos de mercúrio e de compostos de selénio que não induzem citotoxicidade nas células SH-SY5Y;

- Verificar se a atividade do sistema da tioredoxina inibida pelos compostos de mercúrio pode ser reativada pelo tratamento das células com compostos de selénio, procedendo à avaliação dos efeitos desta co-exposição através da determinação da atividade da TrxR em lisados celulares.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

1. Equipamentos gerais

Balança analítica - Mettler Toledo AB204-S/FACT

Agitador magnético - Heidolph MR 2000

Medidor de pH digital - Orion Research/ Model 701

Vórtex - Retch Mixer e Heidolph Reax Top

Banho de aquecimento - Shel Lab H₂O Bath e Sotel Thermomix 1419

Incubadora - Shel Lab

Centrífuga refrigerada - Sigma 3-16PK

Microcentrífuga refrigerada - Eppendorf 5424R

Espectrofotômetro UV-Visível - Hitachi U-2000

Agitador de placas - Digisystem Laboratory Instruments, Inc.

Leitor de microplacas - Alfacene Anthos Zenyth 3100

Todo o material utilizado para trabalho na câmara de fluxo foi adquirido esterilizado (uso único ou descartável) ou foi descontaminado através da sua esterilização em autoclave (*Steryl*), seguido de secagem em estufa (*Memmert*) a temperatura média de 80°C.

2. Cultura celular

2.1. Condições de cultura

O crescimento e a manutenção de células mamíferas *in vitro* implicam a mimetização das condições que o permitiriam *in vivo*. Tais condições incluem uma temperatura ótima bem como níveis de oxigênio (O₂), dióxido de carbono (CO₂), pH, osmolaridade, humidade relativa e nutrição adequados. O meio de cultura trata-se, assim, do componente mais importante para a cultura *in vitro*, uma vez que a incubadora é apenas responsável pela manutenção de uma temperatura específica e de níveis apropriados de O₂ e de CO₂. A função do meio de cultura consiste em fornecer às células as substâncias que estas não conseguem produzir. Para além disso, também garante um ambiente estimulante do crescimento celular através da manutenção de níveis de pH e de osmolaridade apropriados às necessidades da cultura. Como

tal, um meio de cultura completo apresenta dois componentes: a) meio basal que forneça nutrientes, sais e possibilite o controlo do pH e b) suplementos que potenciem o crescimento celular, como o soro (Cartwright and Shah, 2002). O último contém fatores de crescimento e de adesão, minerais, lípidos e hormonas (Freshney, 2005a).

As células de neuroblastoma humano SH-SY5Y usadas no decorrer deste estudo foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Doutora Dora Brites (Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa). Foram mantidas em cultura em frascos T de 75 cm² (Nunc) com meio de cultura composto por uma mistura de 1:1 de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco) e de F12 (Gibco), suplementado com 5% de uma mistura antibiótica de Penicilina/ Estreptomicina (Gibco) e com 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco), previamente inativado por incubação a 56°C durante 30 min. As células foram mantidas em atmosfera húmida a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultura, previamente aquecido a 37°C, foi mudado uma vez por semana de modo a favorecer a proliferação celular.

As células foram mantidas em cultura até atingirem 80% de confluência, altura na qual se procedeu à sua subcultura para manutenção da linha celular e/ ou utilização em experiências (Figura 12). Tal envolve a remoção do meio de cultura e a dissociação das células na monocamada aderente com Tripsina - EDTA (1X) 0,05% (Gibco).

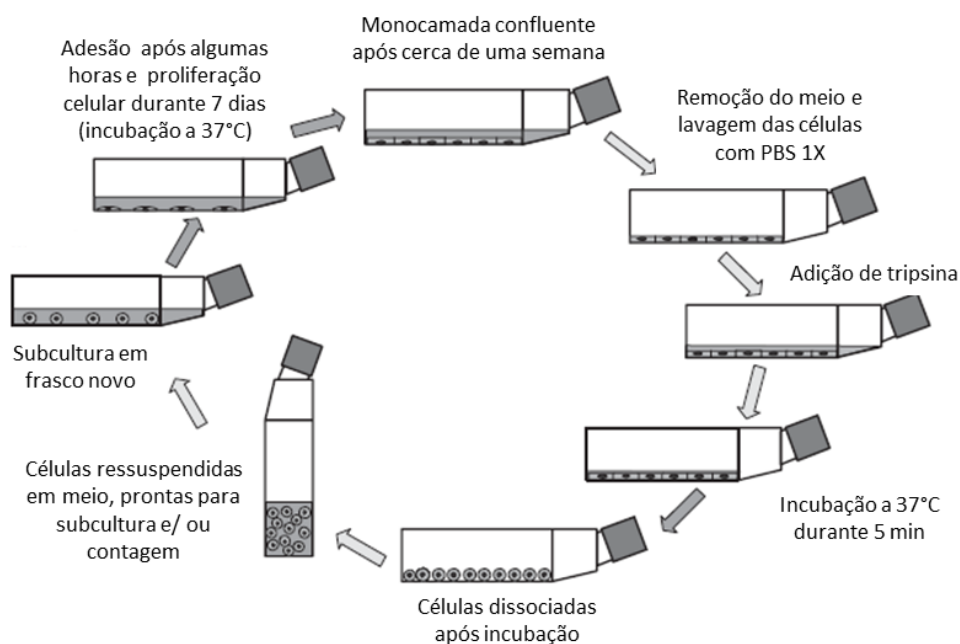


Figura 12 – Fases da subcultura e proliferação celular (adaptado de Freshney, 2005b).

2.2. Contagem celular

A contagem do número de células é importante para a caracterização das propriedades de crescimento de diferentes linhas celulares mas principalmente para garantir que as condições experimentais são reprodutíveis (Freshney, 2005c).

O número de células numa suspensão foi determinado através da aplicação de um pequeno volume desta sobre uma câmara de Neubauer (*Hirschmann Techcolor Series*), posteriormente observada num microscópio ótico (*Olympus CH-2*). A câmara de Neubauer trata-se de uma lâmina de maior espessura que apresenta, à superfície, duas zonas divididas em quadrados de áreas conhecidas, organizados segundo uma grelha (Figura 13). O fabrico preciso desta lâmina permite que o líquido seja introduzido entre ela e a lamela colocada sobre a zona da grelha, garantindo que a quantidade de líquido analisado é constante (10^{-4} mL) (Schantz and Ng, 2010).

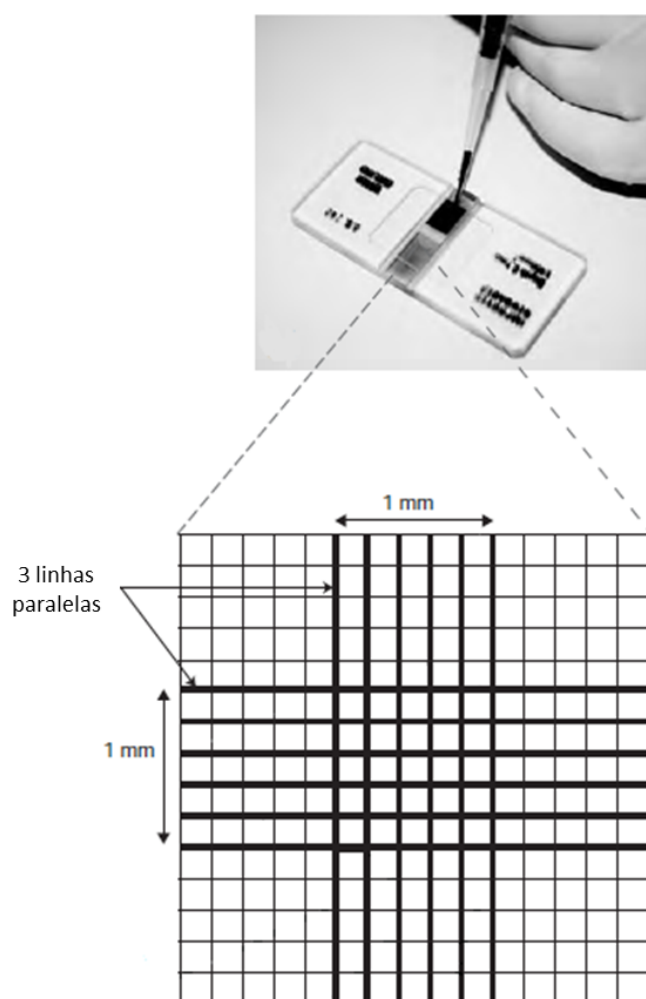


Figura 13 – Câmara de Neubauer (adaptado de Freshney, 2005c).

2.3. Ensaio de viabilidade celular (citotoxicidade)

2.3.1. Reagentes

Solução salina de tampão fosfato (PBS) 1X (*Gibco*); cloreto de metilmercúrio (MeHgCl), cloreto de mercúrio (HgCl_2), selenito de sódio (Na_2SeO_3), selenato de sódio (Na_2SeO_4), seleno-DL-metionina (SeMet; $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$), seleno-DL-cistina (SeC-SeC; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{Se}_2$), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma*); glicina (Gly), cloreto de sódio (NaCl) (*Merck*).

No decorrer das atividades experimentais, a selenocistina foi testada ao invés da selenocisteína uma vez que a primeira apresenta maior estabilidade. Para além disso, a selenocistina trata-se de um dímero de selenocisteína, dissociando-se em condições de ensaio.

2.3.2. Soluções

- PBS 1X: diluição 1:10 da solução de PBS 10X com água bidestilada esterilizada por autoclavagem;
- As soluções *stock* de MeHgCl, HgCl_2 , Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , SeMet e de SeC-SeC foram preparadas na concentração de 100 mM. Seguidamente foram diluídas até às concentrações desejadas para as soluções intermédias com PBS 1X estéril na câmara de fluxo;
- MTT (2 mg/mL): 100 mg de MTT dissolvidos em 50 mL de PBS 1X estéril. Após homogeneização no vórtex, a solução é esterilizada recorrendo-se a um filtro com poros de 0,2 μm (*VWR Cellulose Acetate Sterile*). As alíquotas de MTT são guardadas a -20°C e devidamente protegidas da luz;
- Tampão glicina pH 10,5: 750,8 mg de Gly e 584,4 mg de NaCl dissolvidos em 100 mL de água bidestilada seguido de ajuste do pH até 10,5 com NaOH 1 M.

2.3.3. Procedimento experimental

As células foram semeadas em microplacas de 96 poços (*Nunc*) a uma densidade de 4×10^3 células/ poço e incubadas a 37°C e 5% de CO_2 , durante 24 horas. Findo este período que visou garantir a aderência das células ao fundo dos poços, procedeu-se à adição de diferentes concentrações de HgCl_2 (0; 1; 5; 10; 20; 50 μM), MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 μM), Na_2SeO_3 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM), Na_2SeO_4 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM), SeMet (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) ou SeC-SeC (0; 5; 12,5; 25; 37,5; 50 μM). Estas concentrações finais foram obtidas por diluição

das soluções intermédias no meio de cultura. Os poços usados para controlo foram tratados exatamente da mesma forma que a descrita acima com a exceção de não lhes terem sido adicionados os compostos referidos anteriormente, mas antes PBS 1X na mesma quantidade. No caso dos ensaios em que se estudou os efeitos do MeHgCl, os poços controlo foram tratados com DMSO e a concentração final deste no meio de cultura não excedeu 0,1% (Carvalho et al., 2008b; Carvalho et al., 2011).

A viabilidade celular foi determinada no momento de adição dos compostos (0h) e após 24, 48 e 72h de exposição a estes através do ensaio do MTT (Carvalho et al., 2008b; Carvalho et al., 2011). O ensaio do MTT é um teste quantitativo do tipo colorimétrico, muito utilizado *in vitro* como revelador da proliferação celular (Denizot and Lang, 1986; Mosmann, 1983). O MTT trata-se de um sal de cor amarela solúvel em água que as desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente viáveis reduzem à forma de cristais de formazan de cor roxa que, por serem insolúveis em água, são incapazes de atravessar a membrana plasmática (Figura 14). Como tal, estes cristais acumulam-se no interior do citoplasma das células vivas presentes em cultura.

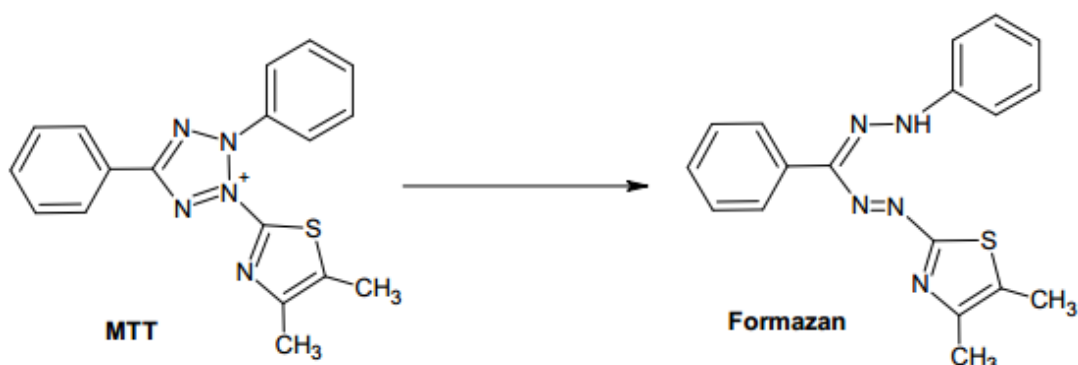


Figura 14 – Redução da molécula de MTT à forma de formazan graças à ação da enzima succinato desidrogenase mitocondrial.

Assim, o MTT foi adicionado a cada poço (concentração final de 400 µg/mL) e as placas foram incubadas a 37°C durante 4 horas, de modo a que as células viáveis pudessem metabolizar este sal. No final da incubação, o meio foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 150 µL de tampão DMSO/Glicina pH 10,5 (4:1). Após 20 minutos de agitação, a viabilidade foi avaliada pela leitura da absorvência do formazan a 550 nm no leitor de microplacas, tendo em consideração que a viabilidade celular é proporcional à quantidade de formazan formado (Carvalho et al., 2008b; Carvalho et al., 2011).

2.4. Preparação de lisados celulares

2.4.1. Reagentes

Solução salina de tampão fosfato (PBS) 1X (*Gibco*); cloreto de metilmercúrio (MeHgCl), cloreto de mercúrio (HgCl₂), selenito de sódio (Na₂SeO₃), seleno-DL-metionina (SeMet; C₅H₁₁NO₂Se) (*Sigma*); comprimido inibidor de protease (*Roche*).

2.4.2. Soluções

- PBS 1X: diluição 1:10 da solução de PBS 10X com água bidestilada esterilizada por autoclavagem;
- As soluções *stock* de MeHgCl, HgCl₂, Na₂SeO₃ e de SeMet foram preparadas na concentração de 100 mM. Seguidamente foram diluídas até às concentrações desejadas para as soluções intermédias com PBS 1X estéril na câmara de fluxo;
- Tampão de lise celular: 25 mM Tris-HCl (pH 7,5); 100 mM NaCl; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM EGTA; 20 mM NaF; 1 mM Na₃VO₄; 20 mM β-glicerofosfato de sódio; 20 mM pirofosfato de sódio; 0,5% Triton X-100 com *cocktail* inibitório de proteases (1 comprimido por 10 mL).

2.4.3. Procedimento experimental

A preparação dos lisados celulares foi efetuada de acordo com a metodologia indicada em Carvalho et al. (2008b) com algumas adaptações. Assim, no decorrer do trabalho experimental, as células foram semeadas em caixas de 6 poços (*Corning*) a uma densidade de 3x10⁵ células/ poço em 3 mL de meio de cultura. Ao atingirem uma confluência na ordem de 80%, as células foram incubadas com meio de cultura novo contendo diferentes concentrações de HgCl₂ (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM), MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM), Na₂SeO₃ (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) ou SeMet (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) durante 24h. Na fase seguinte da atividade experimental, procedeu-se à co-exposição de 2,5 μM de Na₂SeO₃ ou de SeMet com os compostos mercuriais nas concentrações previamente indicadas. Estas condições de co-exposição foram conseguidas através da adição dos compostos de Hg imediatamente após a adição do Na₂SeO₃ ou da SeMet e o tempo de incubação das células assim tratadas foi igualmente de 24h. No fim deste período de tratamento, os lisados correspondentes aos controlos e às células tratadas com compostos mercuriais e/ ou de selénio foram obtidos através da lise do *pellet* (composto por células aderentes e não-aderentes) com o tampão de lise.

Os lisados recolhidos foram posteriormente usados na determinação da atividade enzimática da TrxR descrita em 3.2..

3. Determinação de atividades enzimáticas

Os lisados celulares receberam um pré-tratamento antes de serem usados. Este envolveu a sua centrifugação a 4°C e 12 000 rpm durante 7 minutos numa microcentrífuga refrigerada. Tal permitiu a remoção das impurezas resultantes da lise celular por rejeição do *pellet*.

3.1. Quantificação proteica

A quantificação da proteína total presente nas amostras foi efetuada recorrendo ao método de Bradford (Bradford, 1976). Assim, rapidamente, 1 µL de cada amostra foi incubado com o corante Azul de Coomassie (*Bio-Rad*; diluído 5 vezes) numa microplaca de 96 poços (*Nunc*) que foi posteriormente lida a 595 nm no leitor de microplacas. A concentração proteica em cada amostra é então calculada a partir de uma curva de calibração na qual a BSA 1 mg/mL é usada como padrão nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 µg/µL.

3.2. Determinação da atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR)

3.2.1. Reagentes

Tampão HEPES, EDTA, insulina humana recombinante, NADPH, Tris, guanidina, DTNB (*Sigma*).

3.2.2. Soluções

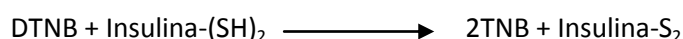
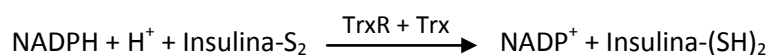
- Trx humana: efetua-se um tratamento com ditioneitol (DTT) de modo a se obter a forma completamente reduzida da proteína, que é, em seguida, purificada numa coluna Sephadex G-25 NAP-5 (*GE Healthcare*) pré-equilibrada com Tampão Tris-HCl 50 mM EDTA 2 mM pH 7,5 (tampão TE). A concentração proteica da solução eluída é determinada espectralmente;

- Insulina humana recombinante 1,6 mM: 50 mg de insulina dissolvidos em 2,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Em seguida, ajustou-se o pH para 2 a 3 com HCl 1 M de modo a garantir a dissolução completa e, quando tal acontecer, repor o pH original do tampão com NaOH 1 M. Ajustar o volume final de 5 mL com água bidestilada;

- NADPH 50 mM: pesar 8,5 mg de NADPH em *ependorfs* que deverão ser guardados a -20°C. Na altura de uso, dissolver o composto em 200 µL de água bidestilada. Esta solução apenas pode ser utilizada enquanto não se apresenta amarela, pois tal mudança indica que ocorreu a oxidação do NADPH.
- HEPES 200 mM pH 7,6
- EDTA 0,2 mM
- Tris 1 M pH 8,0 e 50 mM pH 7,5
- Guanidina 6 M
- DTNB 25 mg/mL

3.2.3. Procedimento experimental

A atividade enzimática da TrxR foi determinada de acordo com o ensaio de *end-point* da insulina descrito por Arnér e Holmgren (1999). Os lisados celulares foram incubados juntamente com insulina e NADPH. O sistema da tiorredoxina nas células reduz os grupos tiol oxidados na insulina produzindo NADP⁺. Esta reação é parada após a adição de guanidina e o número de grupos tiol reduzidos na insulina é determinado com DTNB, produzindo ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB):



Como tal, de modo a se determinar a atividade da TrxR, 25 µg de proteína de cada amostra foram incubadas em microplacas de 96 poços (*Nunc*) com 0,3 mM de insulina, 720 µM de NADPH, 2,5 mM de EDTA e 3 µM de Trx humana completamente reduzida em 85 mM de tampão HEPES (pH 7,6) durante 20 minutos à temperatura ambiente. Em paralelo, prepararam-se poços controlo contendo os mesmos reagentes previamente mencionados com a exceção de Trx. Após o período de incubação referido, 250 µL de uma solução de DTNB 1 mM em hidrocloreto de guanidina 6 M (pH 8,0) foi adicionada a cada poço e as absorvências foram medidas a 412 nm no leitor de microplacas. A quantificação da atividade da TrxR foi efetuada tendo em conta a diferença das absorvências entre os poços contendo Trx e os poços controlo. Os resultados apresentam as atividades enzimáticas expressas em percentagens relativamente ao controlo (Carvalho et al., 2008b).

4. Análise estatística

Os resultados são apresentados na forma de valor médio \pm erro padrão. A análise estatística dos dados obtidos no decurso do presente trabalho foi efetuada com o *software* STATISTICA®. O teste de Shapiro-Wilk foi usado no sentido de se verificar a normalidade dos dados e o teste de Levene foi aplicado de modo a se averiguar a homogeneidade das variâncias. Tendo em consideração os resultados destes testes, o teste paramétrico t-student foi usado para examinar as diferenças entre grupos. Este teste assume que as amostras provêm de populações com distribuição normal e variâncias idênticas. No entanto, no campo da investigação, nem sempre se pode garantir que tais condições são cumpridas mas numerosos estudos demonstraram que o teste t-student é suficientemente robusto para permitir desvios consideráveis da sua base teórica sem perda da fidedignidade dos resultados que produz (Zar, 1996). Como tal, as diferenças entre grupos foram consideradas muito significativas para $p\text{-value} < 0,01$ e significativas para $p\text{-value} < 0,05$.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

1. Ensaios de viabilidade celular (citotoxicidade)

Os efeitos causados pelos compostos mercuriais e de selénio no crescimento das células SH-SY5Y foram avaliados pelo ensaio de viabilidade celular do MTT. Tanto o Hg^{2+} (Figura 15A) como o MeHg (Figura 15B) exerceram uma inibição no crescimento celular dependente das concentrações testadas. No entanto, o MeHg foi mais tóxico para as células SH-SY5Y como se pode concluir pelo valor de GI_{50} consideravelmente mais baixo ($0,6 \mu\text{M}$ vs. $8,7 \mu\text{M}$ para o MeHg e Hg^{2+} , respetivamente) após 72h de exposição (Figura 15; Tabela 3). Os ensaios de viabilidade efetuados para tempos de exposição menores como 24 e 48h demonstraram valores de GI_{50} comparáveis aos obtidos nos tratamentos de 72h. É ainda de referir que nos ensaios de viabilidade onde se estudou o efeito citotóxico do MeHg, os poços controlo foram tratados com DMSO e a concentração final deste no meio de cultura não excedeu 0,1%, tal como foi referido anteriormente no Capítulo 2. A proliferação das células assim tratadas não diferiu da proliferação das células em poços controlo tratadas com PBS 1X e, como tal, o DMSO não foi tóxico para as células SH-SY5Y nesta concentração.

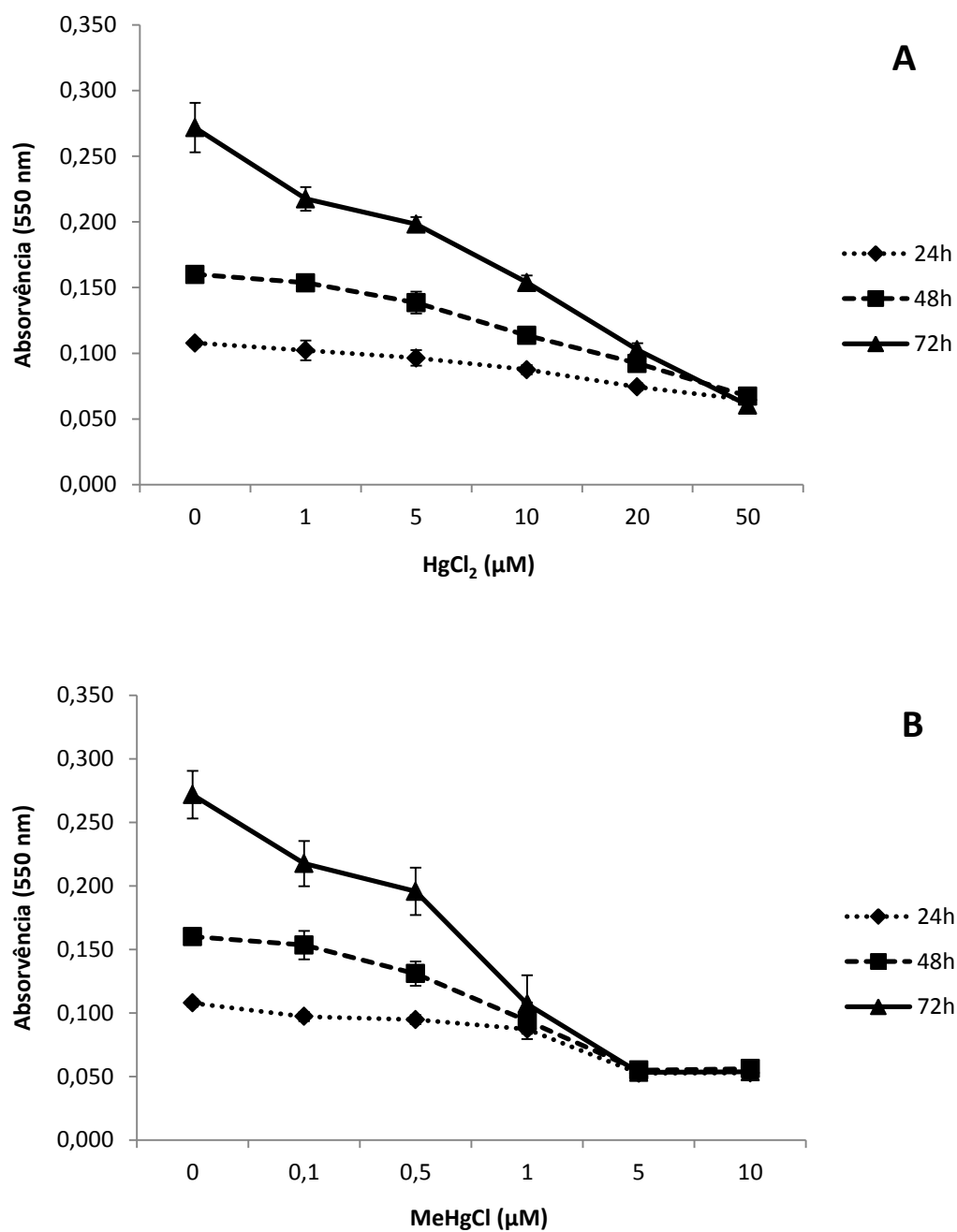


Figura 15 – Toxicidade causada pelos compostos mercuriais no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de HgCl₂ (0; 1; 5; 10; 20; 50 µM) (A) e de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 µM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média ± erro padrão de 4 experiências independentes.

Tabela 3 – Valores de GI_{50} refletindo os efeitos dos compostos mercuriais na viabilidade das células SH-SY5Y em diferentes tempos de exposição medidos pelo ensaio do MTT.

| Composto | GI_{50}^* (μM) | | |
|-------------------|-------------------------|----------------|---------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| HgCl ₂ | 10,4 \pm 1,1 | 10,6 \pm 1,1 | 8,7 \pm 1,5 |
| MeHgCl | 1,0 \pm 0,3 | 0,9 \pm 0,3 | 0,6 \pm 0,2 |

* GI_{50} : concentração do composto que inibe o crescimento celular em 50%.

Os resultados obtidos neste ensaio demonstraram que o MeHg é muito mais tóxico para as células SH-SY5Y do que o Hg²⁺. O MeHg acumula-se mais rapidamente nas células do que o Hg²⁺ e esta diferença na citotoxicidade dos compostos mercuriais deve-se provavelmente ao facto do HgCl₂ ser menos eficiente que o MeHgCl na penetração da membrana plasmática. O resultado obtido está de acordo com o observado em outros estudos relacionados com a citotoxicidade (GI_{50}) dos compostos mercuriais em células PC-12 (0,32 μM e 8,18 μM de MeHg e Hg²⁺, respetivamente; Parran et al., 2001), células K-562 (5 μM e 50 μM de MeHg e Hg²⁺, respetivamente; Frisk et al., 2000) e células HeLa (2,9 μM e 20,6 μM de MeHg e Hg²⁺, respetivamente) e células HEK 293 (2,8 μM e 6 μM de MeHg e Hg²⁺, respetivamente) (Carvalho et al., 2008b). Para além disso, os resultados obtidos podem também ser apoiados em estudos realizados com células SH-SY5Y apresentados por alguns autores. Kim et al. (2005) determinaram um valor de GI_{50} de 1,8 μM após 48h de exposição ao MeHg e Toimela and Tähti (2004) determinaram valores de GI_{50} de 9 μM e de 1,14 μM após 24h de exposição a Hg²⁺ e a MeHg, respetivamente. De facto, as células SH-SY5Y são alvo da toxicidade causada pelo MeHg e vários estudos sugerem que o último atua em diversos níveis nesta linha celular, conduzindo à inibição da sua proliferação e, eventualmente, causando a morte provavelmente por mais do que um processo que pode envolver mecanismos aditivos ou sinérgicos (Kim et al., 2005).

Os efeitos citotóxicos dos compostos de selénio, nomeadamente, Na₂SeO₃, Na₂SeO₄, SeMet e SeC-SeC, também foram avaliados nas células SH-SY5Y pelo ensaio do MTT. Neste caso, para os quatro compostos testados, nenhum deles causou uma diminuição em 50% na viabilidade das células em cultura para todas as concentrações testadas, podendo considerar-se que o valor de GI_{50} é maior que 100 μM para os compostos Na₂SeO₃, Na₂SeO₄ e SeMet e maior que 50 μM para o composto SeC-SeC (Figuras 16 e 17).

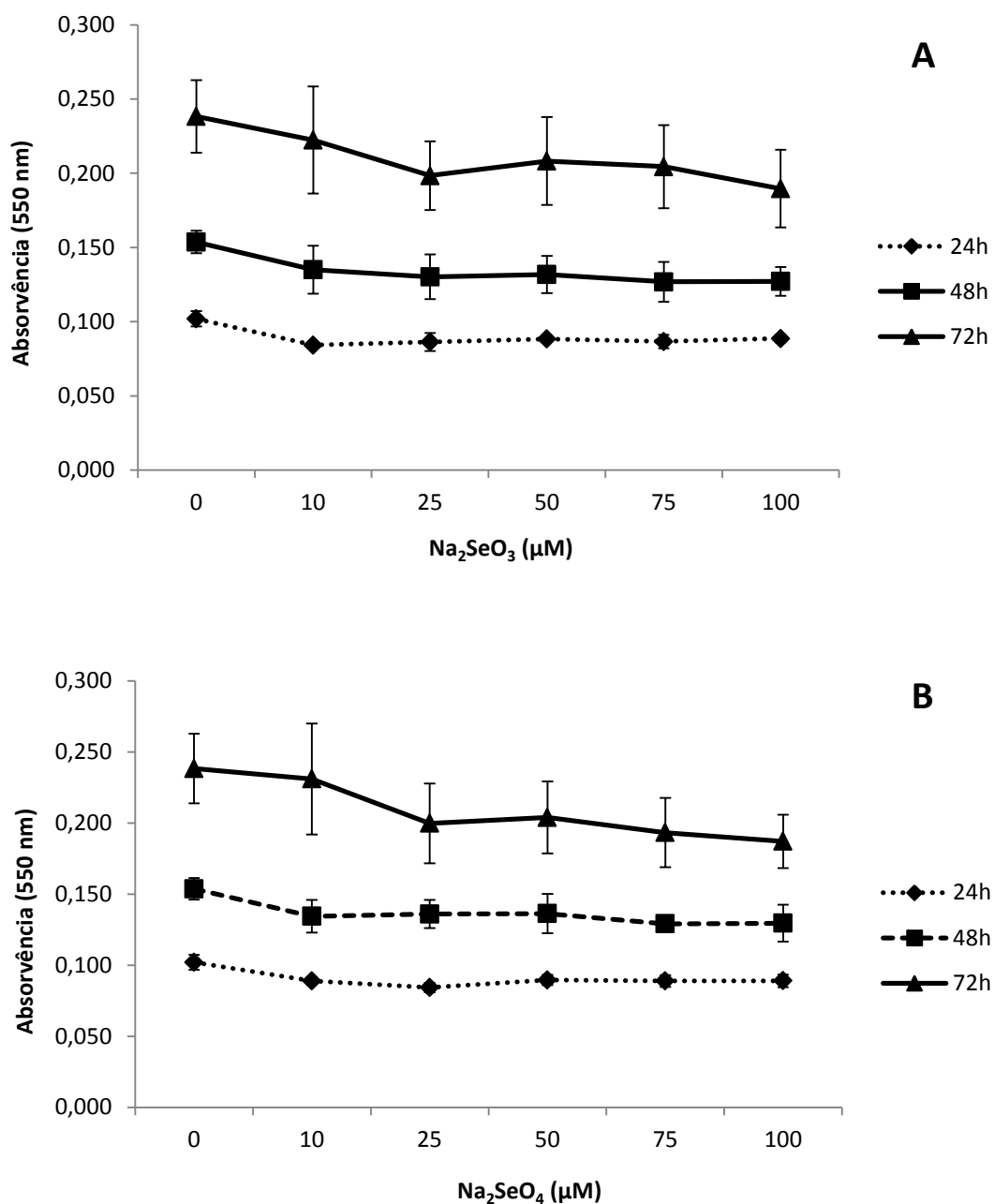


Figura 16 – Efeitos causados pelos compostos inorgânicos de selênio no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de Na_2SeO_3 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (A) e de Na_2SeO_4 (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes.

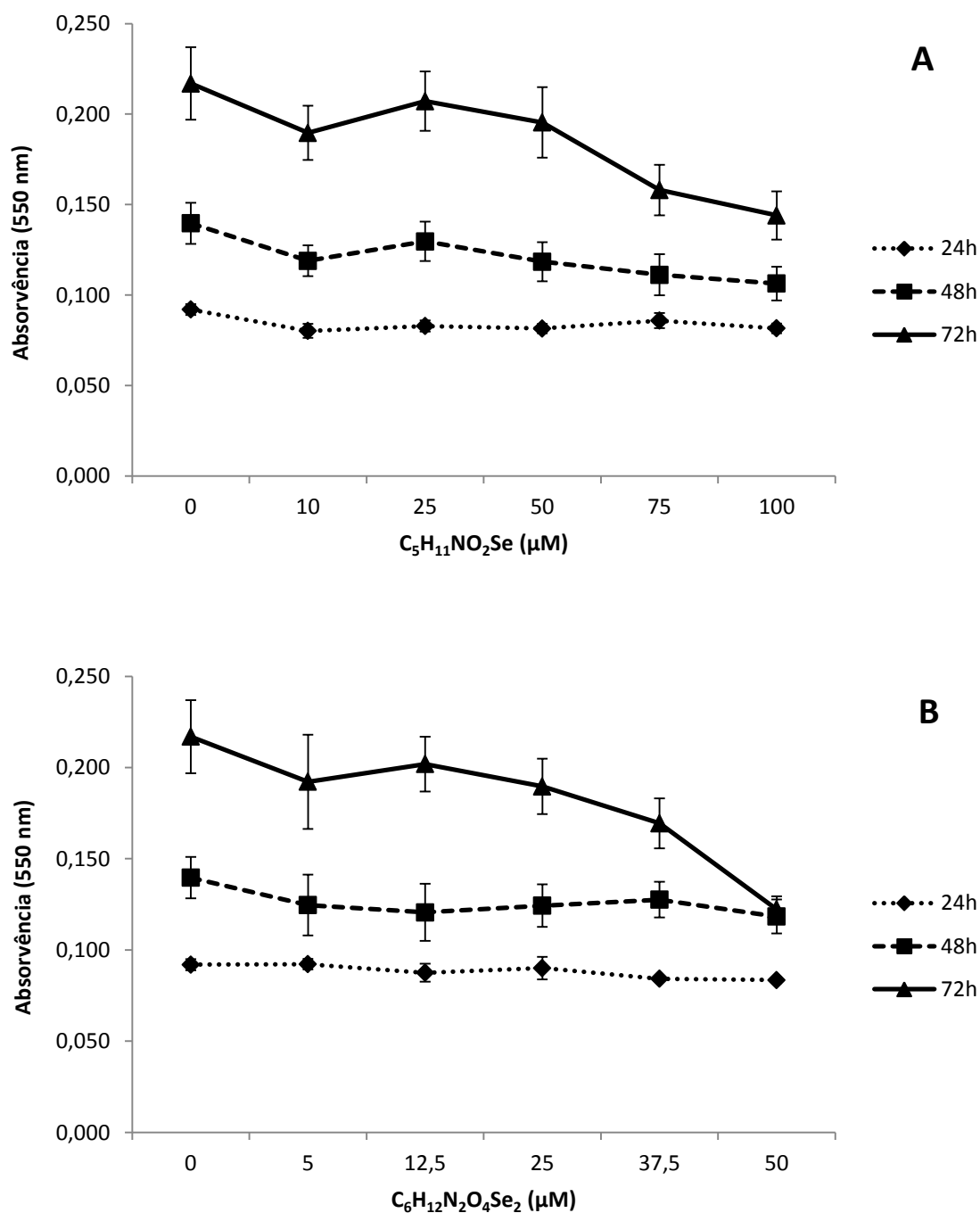


Figura 17 – Efeitos causados pelos compostos orgânicos de selênio no crescimento celular. As células SH-SY5Y foram expostas a diferentes concentrações de SeMet (0; 10; 25; 50; 75; 100 μM) (A) e de SeC-SeC (0; 5; 12,5; 25; 37,5; 50 μM) (B) durante 24, 48 e 72h após as quais a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes.

Vários estudos realizados em diferentes linhas celulares referem os efeitos citotóxicos consideráveis que podem ser originados pelos compostos de selênio. No entanto, no presente trabalho, não foi observado um efeito negativo expressivo na viabilidade das células SH-SY5Y causado por estes compostos. De facto, tal como foi referido acima, nenhum dos quatro compostos (Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 , SeMet e SeC-SeC) nas concentrações testadas reduziu em 50% a viabilidade celular para qualquer tempo de exposição. Os trabalhos efetuados por Lunøe et al. (2011) apoiam os resultados obtidos neste trabalho, uma vez que, ao testarem os mesmos compostos nas células HT-29, a sua toxicidade foi também muito reduzida. As mesmas observações foram efetuadas por Corcoran et al. (2010) em células SH-SY5Y e BE2M17, Chen and Wong (2008) em células HS68 e Detroit 551, Goel et al. (2006) em células SNU-1 e Eersel et al. (2010) em células SH-SY5Y. As discrepâncias observadas nos trabalhos experimentais focados na citotoxicidade do selênio demonstram a grande importância da seleção da linha celular a ser estudada. Assim, a toxicidade de um composto de selênio numa determinada linha celular dependerá de fatores determinantes para as vias metabólicas que o composto em causa utilizará na indução de efeitos tóxicos, sendo esta a razão pela qual o estudo do mesmo composto em linhas celulares diferentes pode produzir efeitos também muito diferentes entre si (e.g. Caffrey and Frenkel, 1992) (Lunøe et al., 2011; Philchenkov et al., 2007).

2. Ensaio de determinação da atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR)

2.1. Efeito da exposição a compostos mercuriais na atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR)

De modo a estudar a base molecular da interação entre compostos mercuriais com o sistema da tiorredoxina, o trabalho experimental progrediu com a determinação da atividade enzimática da tiorredoxina redutase. Assim, com base nos resultados apresentados em 1., procedeu-se à seleção dos intervalos de concentrações que foram testados nestas experiências. Como tal, as concentrações dos compostos mercuriais foram definidas de acordo com os resultados presentes na Tabela 3.

A atividade enzimática da TrxR foi determinada em lisados celulares usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. O efeito dos compostos mercuriais no sistema da tiorredoxina foi avaliado para o mercúrio mercúrico e para o metilmercúrio. Após 24h de exposição, ambos os compostos mercuriais testados originaram uma inibição dose-dependente da atividade enzimática da TrxR (Figura 18). O MeHg tratou-se de um inibidor mais potente desta

selenoenzima que o Hg^{2+} pois observou-se uma inibição de 70% e de 50% a 5 μM de MeHg e de Hg^{2+} , respetivamente. Este resultado é de grande importância pelo facto de revelar a toxicidade significativa exercida por estes compostos sobre as células SH-SY5Y.

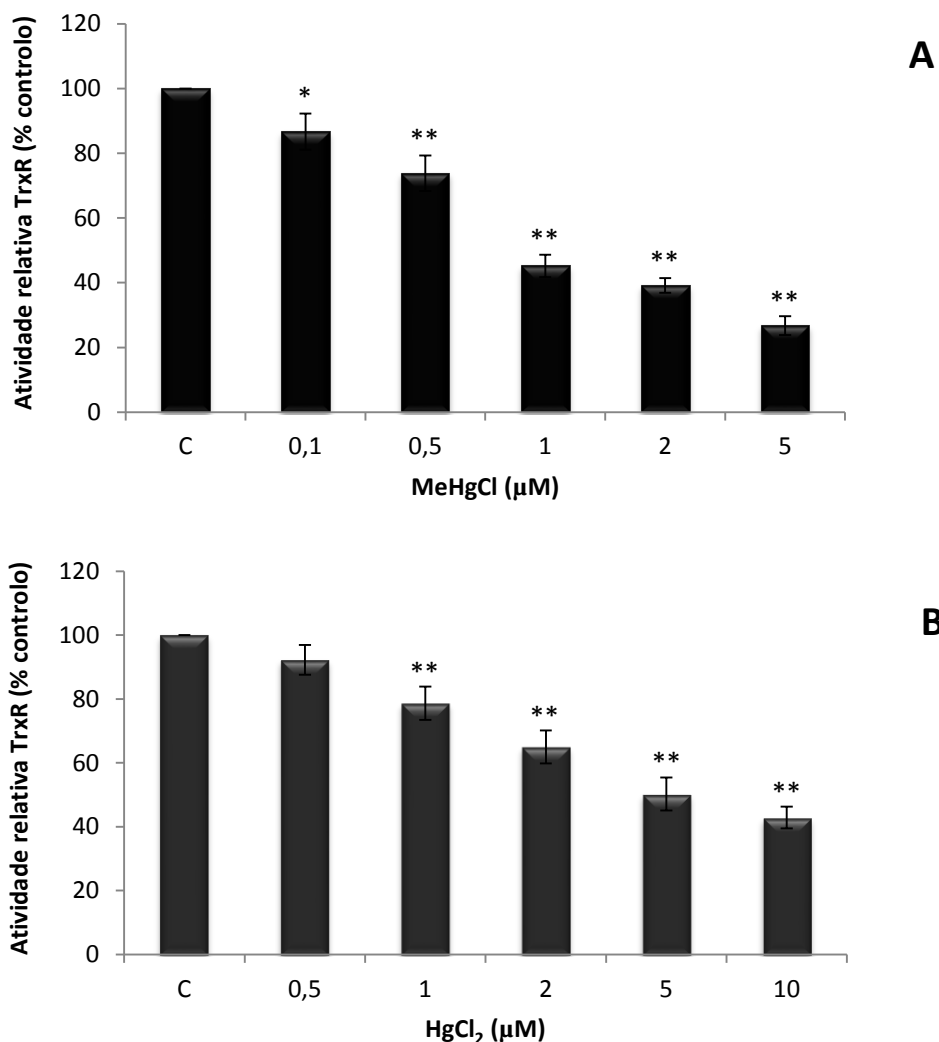


Figura 18 – Efeito dos compostos mercuriais na atividade enzimática da TrxR em células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de HgCl_2 (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo. Os dados representam a média \pm erro padrão de 7 experiências independentes. *: significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,05); **: muito significativamente diferente do controlo (C_0) (p-value<0,01).

A exposição ao MeHg e ao Hg^{2+} diminuiu significativamente a atividade enzimática da TrxR, tendo-se observado que o primeiro se tratou do inibidor mais potente desta enzima. Estes resultados estão de acordo com o observado por Carvalho et al. (2008b) em células HeLa e HEK 293. A atividade catalítica das selenoenzimas, como é o caso da TrxR, depende do estado bioquímico do resíduo de SeC presente no seu centro ativo. Tal como foi referido no Capítulo 1, o grupo selenol do resíduo SeC é ionizado em condições fisiológicas de pH, sendo, assim, mais reativo que o grupo tiol no resíduo de Cys e, apesar destas características contribuírem para a grande importância da TrxR do ponto de vista fisiológico, também a tornam mais vulnerável à toxicidade exercida pelo mercúrio. A suscetibilidade da TrxR observada para com o MeHg é de grande importância uma vez que o sistema da tiorredoxina é ubíquo e expresso a montante de uma rede que compreende várias vias envolvidas na sinalização e função celular e, como tal, a sua inibição iria comprometer a proliferação e sobrevivência das células. Para além disso, o papel desempenhado pelo sistema da tiorredoxina no controlo do potencial redox celular e na defesa antioxidante implica que a sua inibição poderá resultar num aumento do nível celular de ROS. Como tal, um dos mecanismos pelos quais o MeHg pode induzir *stress* oxidativo poderá ser pela inibição da TrxR (Wagner et al., 2010). Assim, o resultado obtido no presente trabalho reforça o papel central desempenhado pelas selenoproteínas na toxicidade do mercúrio e sugere que a TrxR se trate de um importante alvo molecular *in vitro* para o MeHg.

2.2. Efeito da exposição a compostos de selénio na atividade enzimática da tiorredoxina redutase (TrxR)

Seguidamente, procedeu-se ao estudo da base molecular da interação entre compostos de selénio com o sistema da tiorredoxina. Não tendo sido observada citotoxicidade significativa associada a estes compostos nos ensaios de viabilidade, a gama de concentrações a usar nestas experiências foi definida tendo em consideração os valores de GI_{50} determinados para os compostos em questão bem como a razão Se:Hg, que é de especial importância para os estudos subsequentes. Para além disso, de entre os compostos de selénio testados nos ensaios de viabilidade, foram selecionados um composto orgânico e um composto inorgânico de selénio para prosseguir as experiências. Os efeitos metabólicos causados pelos compostos orgânicos e inorgânicos de selénio são geralmente considerados diferentes, atuando de forma distinta do ponto de vista biológico e com uma eficácia diferenciada no controlo do crescimento de células tumorais (Deagen et al., 1987; Goel et al., 2006). A escolha do

composto inorgânico recaiu no selenito de sódio (Na_2SeO_3), pelo facto de ter sido antes demonstrado, *in vitro* e *in vivo*, que este pode antagonizar os efeitos tóxicos do mercúrio sobre o sistema da tiorredoxina, nomeadamente em hepatócitos (Branco et al., 2012; Carvalho et al., 2011). Por sua vez, o composto orgânico selecionado foi a selenometionina (SeMet), que se trata da principal forma de selénio presente nos alimentos.

A atividade enzimática da TrxR foi determinada em lisados celulares usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. À semelhança das experiências mencionadas em 2.1., o estudo dos efeitos da exposição aos dois compostos de selénio na atividade enzimática da TrxR foi efetuado durante 24h. Como se pode observar na Figura 19, a atividade da TrxR foi ligeiramente diminuída pelo tratamento com Na_2SeO_3 e ligeiramente aumentada pelo tratamento com SeMet, sendo que, no caso do primeiro composto, o valor médio da atividade da enzima foi de 82% e, no caso do segundo composto, este foi de 118%. Os resultados obtidos nesta fase da atividade experimental foram também usados para selecionar uma concentração destes dois compostos a ser utilizada nos estudos subsequentes de co-exposição com os compostos mercuriais. Assim, tanto para o caso do Na_2SeO_3 como para o caso da SeMet, a concentração escolhida foi de 2,5 μM de modo a prevenir efeitos pró-oxidantes que podem estar associados a concentrações mais elevadas de compostos de selénio, como já foi referido anteriormente.

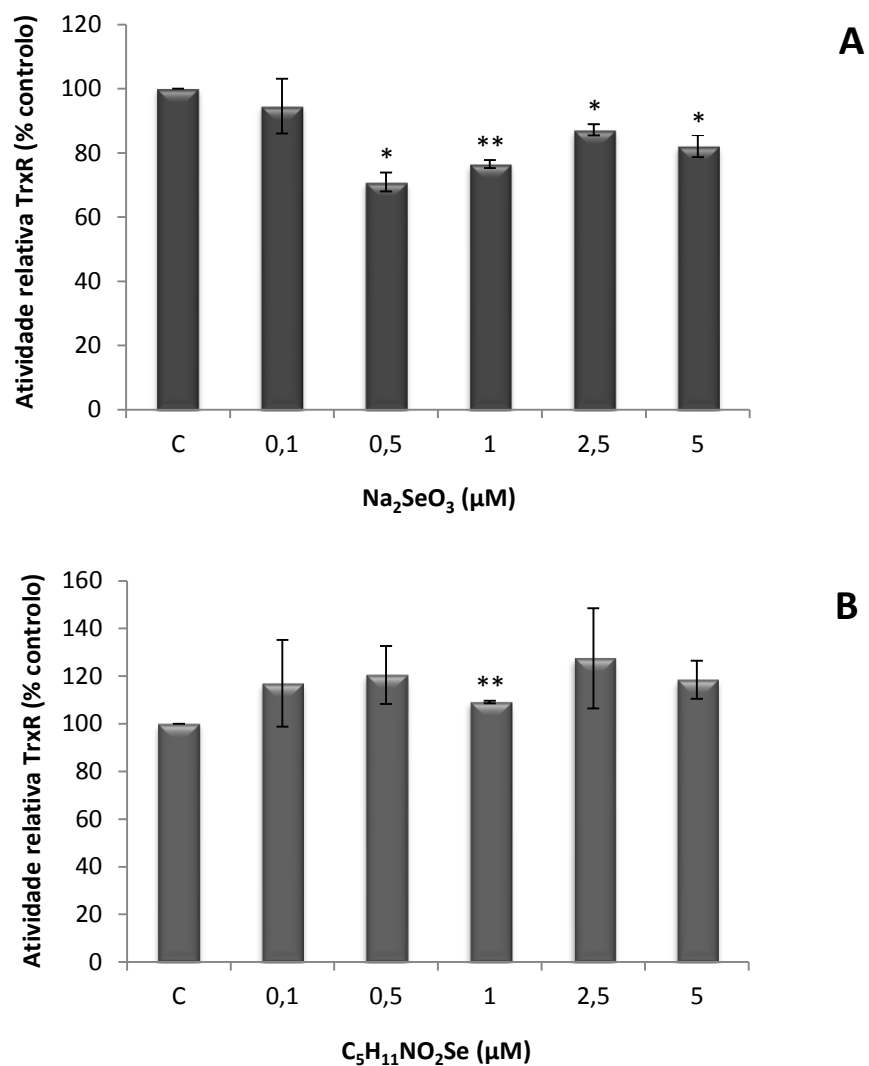


Figura 19 – Efeito dos compostos de selênio na atividade enzimática da TrxR em células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de Na_2SeO_3 (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) (A) ou de SeMet (0; 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 μM) (B) durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controle. Os dados representam a média \pm erro padrão de 3 experiências independentes. *: significativamente diferente do controle (C_0) (p-value<0,05); **: muito significativamente diferente do controle (C_0) (p-value<0,01).

A suplementação da cultura celular com Na_2SeO_3 ou com SeMet não produziu efeitos significativos na atividade enzimática da TrxR relativamente ao controlo. Como seria de esperar sendo a TrxR uma selenoenzima, foi observado que, com o aumento do aporte de selénio, ocorreu um ligeiro aumento na sua atividade enzimática após tratamento das células SH-SY5Y com SeMet. No entanto, no caso do tratamento destas células com Na_2SeO_3 tal não aconteceu, tendo-se observado uma ligeira diminuição na atividade desta selenoenzima. Este resultado pode dever-se à forma química do selénio e ao facto de possuir também uma ação pró-oxidante em concentrações elevadas. De facto, os efeitos inibitórios causados pelo selenito de sódio em processos dependentes da tioredoxina foram já demonstrados num sistema tioredoxina redutase/ tioredoxina purificado de mamífero (Kumar et al., 1992). Nilsson et al. (2006) também observaram uma diminuição na atividade enzimática da TrxR1 após tratamento celular com Na_2SeO_3 num intervalo de concentrações comparável ao usado no presente estudo. O mecanismo na base deste resultado parece estar relacionado com uma redução na síntese enzimática, o que, por sua vez, é compatível com a inibição da síntese de selenoproteínas pela proteína 2 de ligação à SECIS (SBP2) recentemente descrita (Holmgren, 2006). O potencial redox da SBP2 controla a sua localização celular bem como a função de incorporação de SeC (Holmgren, 2006). As células SH-SY5Y, que são altamente suscetíveis ao *stress* oxidativo, reagem com a perda de atividade da TrxR e, como tal, o sequestro nuclear da SBP2 sob condições de *stress* oxidativo poderá tratar-se de um mecanismo de regulação da tradução e síntese de selenoproteínas e poderá estar por detrás dos efeitos provocados pela exposição a selenito de sódio consoante a linha celular em causa (Chen et al., 2006; Holmgren, 2006). De facto, o intervalo de doses de Na_2SeO_3 que estimula a atividade enzimática da TrxR parece variar de forma significativa entre linhas celulares, ocorrendo frequentemente em doses submicromolares (Nilsson et al., 2006; Zhang et al., 2003).

2.3. Efeito da co-exposição a compostos mercuriais e de selénio na atividade enzimática da tioredoxina redutase (TrxR)

O trabalho experimental prosseguiu com o estudo da influência que a co-exposição a selénio poderia ter na interação entre compostos mercuriais e o sistema da tioredoxina, procurando-se definir a gama de concentrações onde esta co-exposição seria eficaz de modo a evitar-se os efeitos pró-oxidantes que também podem estar associados ao tratamento com selénio (e.g. Nilsson et al., 2006). Os compostos de Se demonstraram um efeito protetor significativo quando co-expostos aos compostos mercuriais, apesar do tratamento com

Na_2SeO_3 ou com SeMet nem sempre se ter revelado capaz de prevenir completamente a inibição da atividade enzimática da TrxR causada pelo MeHg ou pelo Hg^{2+} . No entanto, observou-se que o Na_2SeO_3 (Figura 20) conseguiu exercer uma maior proteção da atividade desta selenoenzima aquando da sua interação com Hg^{2+} , sendo que o mesmo foi observado relativamente ao efeito protetor associado à SeMet (Figura 21), pois, em ambos os casos e para algumas concentrações dos compostos mercuriais, observou-se a recuperação total da atividade enzimática da TrxR relativamente ao controlo (C_0). Nas situações em que tal não aconteceu, pôde-se ainda observar em várias condições testadas uma recuperação significativa e até muito significativa da actividade enzimática da tiorredoxina redutase em comparação com a sua actividade inibida pelos compostos mercuriais. Com o aumento das concentrações de MeHg e de Hg^{2+} , o efeito protetor originado pelo tratamento com os compostos de selénio foi diminuindo, como seria de se esperar.

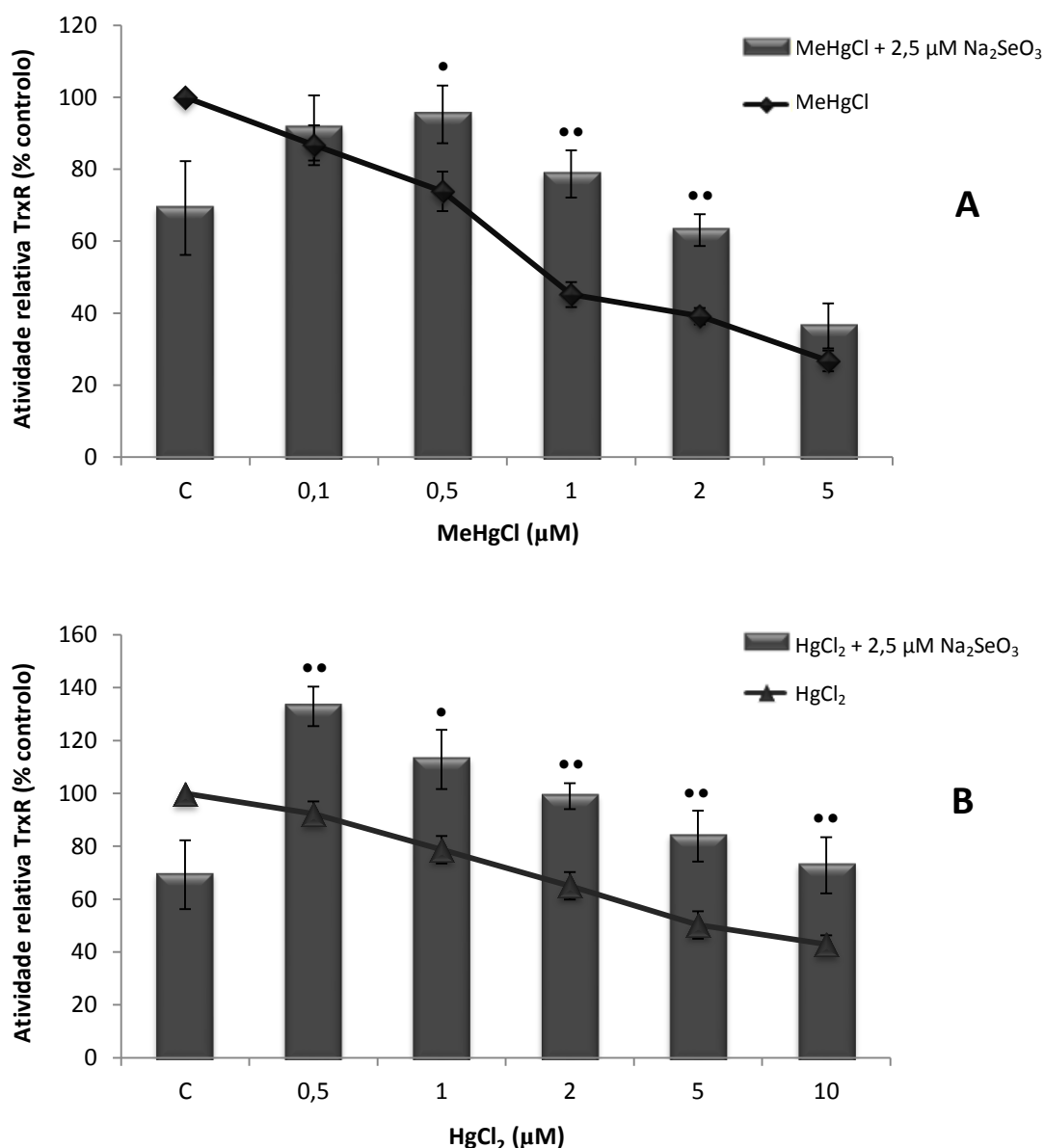


Figura 20 – Efeito da co-exposição a Na₂SeO₃ na atividade enzimática da TrxR inibida pelos compostos mercuriais nas células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de HgCl₂ (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) e a 2,5 μM de Na₂SeO₃ durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade enzimática da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo (sem Na₂SeO₃). Os dados representam a média ± erro padrão de 7 experiências independentes de tratamento celular com MeHgCl e HgCl₂ e a média ± erro padrão de 4 experiências independentes de co-exposição de Na₂SeO₃ com os compostos mercuriais. •: significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,05); ••: muito significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,01).

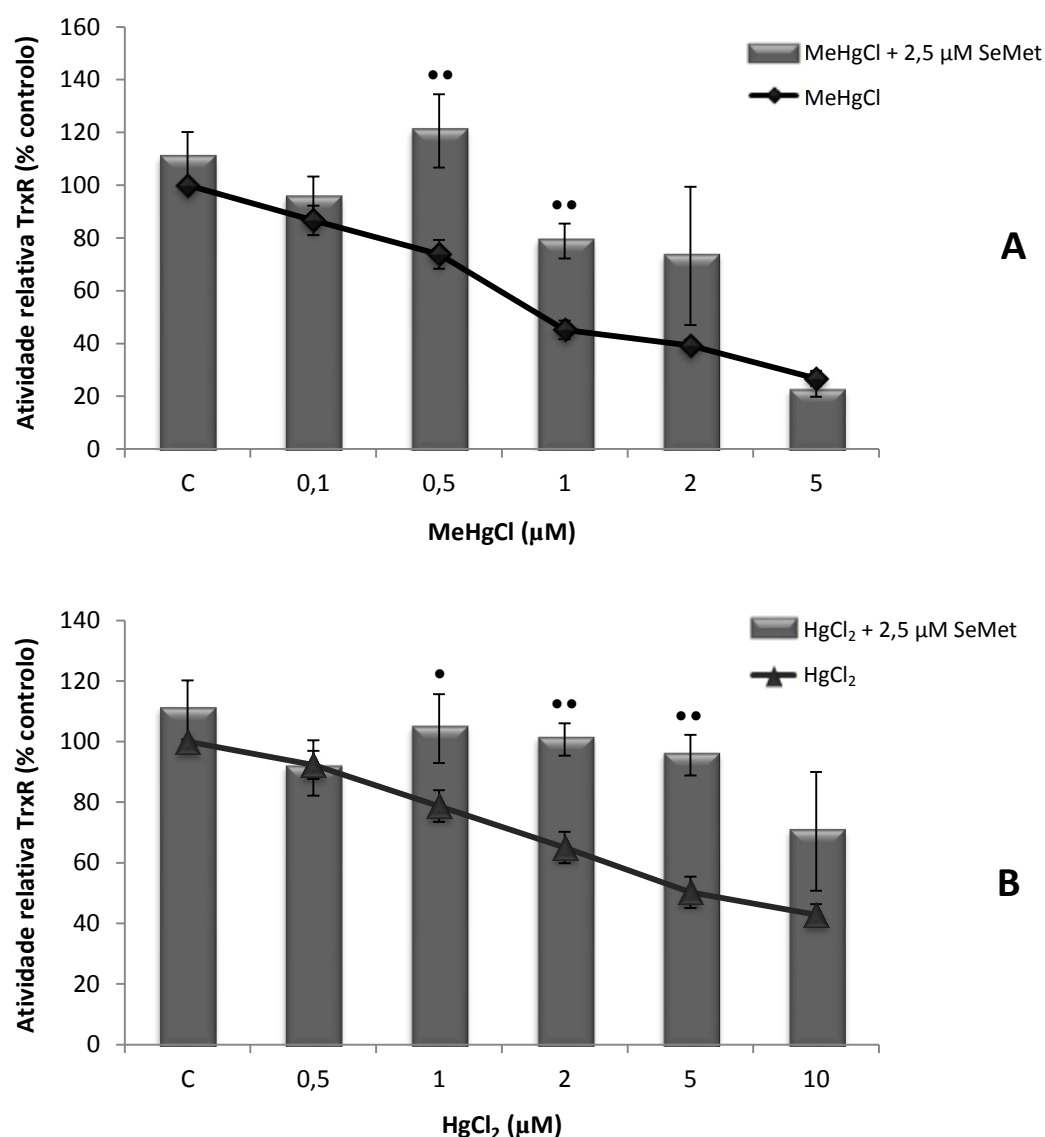


Figura 21 – Efeito da co-exposição a SeMet na atividade enzimática da TrxR inibida pelos compostos mercuriais nas células SH-SY5Y. As células foram expostas a diferentes concentrações de MeHgCl (0; 0,1; 0,5; 1; 2; 5 μM) (A) ou de HgCl₂ (0; 0,5; 1; 2; 5; 10 μM) (B) e a 2,5 μM de SeMet durante 24h e os lisados celulares foram recolhidos para a determinação da atividade enzimática da TrxR usando-se o ensaio de *end-point* da insulina. A atividade da TrxR foi expressa na forma de percentagem em função do controlo (sem SeMet). Os dados representam a média ± erro padrão de 7 experiências independentes de tratamento celular com MeHgCl e HgCl₂ e a média ± erro padrão de 3 experiências independentes de co-exposição de SeMet com os compostos mercuriais. •: significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,05); ••: muito significativamente diferente da exposição respetiva apenas ao composto mercurial (p-value<0,01).

Os compostos de selénio demonstraram um efeito protetor significativo na atividade enzimática da TrxR quando co-expostos aos compostos mercuriais. O selénio apresenta grande eficácia na ligação ao mercúrio provavelmente devido ao facto de, enquanto substrato, ser imediatamente dirigido para o centro ativo da TrxR, aumentando a sua especificidade enquanto antagonista. Assim, a co-exposição de SeMet mas principalmente de Na_2SeO_3 com Hg^{2+} conseguiram prevenir a inibição da TrxR à semelhança do que foi observado em experiências efetuadas com TrxR purificada e com células HEK 293 (Carvalho et al., 2011). Um resultado semelhante foi observado por Branco (2012) em células HepG2, embora, no presente trabalho, a recuperação da actividade da TrxR inibida por Hg^{2+} não tenha sido tão marcada. Por sua vez, quando as células SH-SY5Y foram co-expostas a MeHg e a SeMet, a atividade enzimática da TrxR aumentou para cerca de 120% relativamente ao controlo, indicando a existência de um efeito protetor do selénio contrariamente ao observado por Carvalho et al. (2011) em ensaios com TrxR purificada. No entanto, para todas as condições de co-exposição experimentadas, os efeitos benéficos causados por esta foram diminuindo com o aumento das concentrações dos compostos mercuriais, provavelmente devido a efeitos aditivos pró-oxidantes.

O mecanismo associado ao efeito protetor do selénio é ainda bastante desconhecido. A adição de selenocompostos às culturas celulares aumenta a concentração intracelular de selénio, o que estimula a atividade da selenoproteína glutathione peroxidase e, graças a estudos efetuados *in vivo*, especula-se que o selénio alivie os efeitos neurotóxicos causados pelo mercúrio ao aumentar a sua complexação com a glutathione no cérebro (Sanfeliu et al., 2001). Para além disso, o Se intracelular encontra-se normalmente em excesso relativamente ao Hg e as células neuronais podem assim aceder ao selénio livre de modo a garantir a síntese e atividade adequadas das selenoenzimas. Contudo, quando a concentração de mercúrio nestas células se aproxima ou ultrapassa a de Se (1-2,5 μM), os níveis de selénio disponíveis para a síntese normal de selenoenzimas diminui e, como tal, o efeito protetor causado pela suplementação com este elemento parece advir do Se adicional que consegue contrabalançar a perda do Se sequestrado pelo Hg (Ralston and Raymond, 2010). Para além disso, este efeito protetor não é observado em todas as linhas celulares, o que sugere que os compostos de selénio exerçam este efeito através de processos celulares específicos ao invés de apenas uma reação química direta entre selénio e mercúrio (Valdiglesias et al., 2010). A forma química de selénio e de mercúrio é também determinante para o tipo de interação observada entre os dois elementos e, apesar dos diferentes compostos de selénio gerarem seleneto, nem todos os

compostos mercuriais reagem diretamente com este (Carvalho et al., 2011; Cuvín-Aralar and Furness, 1991).

De um modo geral, os resultados obtidos evidenciam a existência de diferenças importantes entre o MeHg e o Hg^{2+} no que diz respeito à sua toxicidade para com as células SH-SY5Y, o que pode estar relacionado com o facto de afetarem o sistema da tiorredoxina de forma também diferente. A inibição da atividade enzimática da TrxR nas células SH-SY5Y correlacionou-se com a citotoxicidade exercida pelos compostos mercuriais. O MeHg revelou-se o composto com maior capacidade inibitória do crescimento celular e, a concentrações equivalentes, a extensão da inibição da TrxR mediada pelo MeHg foi mais profunda. A maior biodisponibilidade de MeHg nas células e a consequente inibição da atividade da TrxR contribuiu, pelo menos em parte, para a sua maior citotoxicidade. Os resultados apresentados também demonstram que a ação inibitória do MeHg e do Hg^{2+} sobre a atividade enzimática da TrxR pode ser contrariada pela exposição ao Se. Assim, os resultados obtidos em condições de co-exposição dos compostos de selénio com os de mercúrio revelam-se importantes na avaliação dos efeitos benéficos da alimentação rica em selénio contra a toxicidade do mercúrio.

Capítulo 4 – Conclusões gerais e perspectivas futuras

1. Conclusões gerais

Após a realização de estudos de viabilidade celular e de determinação da atividade enzimática da TrxR no sentido de se compreender a forma como os compostos de selénio conseguem prevenir os efeitos inibitórios dos compostos de mercúrio no sistema da tioredoxina e o mecanismo molecular subjacente a este acontecimento, chegou-se às seguintes conclusões:

- O MeHg foi mais citotóxico para as células SH-SY5Y do que o Hg^{2+} , prejudicando o crescimento celular a concentrações mais baixas. De facto, o valor da GI_{50} do MeHg ($0,6 \mu\text{M}$) foi consideravelmente mais baixo (15 vezes) do que o determinado para o Hg^{2+} ($8,7 \mu\text{M}$) após 72h de exposição.
- O Na_2SeO_3 , Na_2SeO_4 e SeMet não induziram uma redução de 50% no crescimento celular mesmo quando o tratamento foi efetuado com concentrações na ordem dos $100 \mu\text{M}$. O mesmo foi observado quando as células SH-SY5Y foram tratadas com SeC-SeC a concentrações até $50 \mu\text{M}$.
- Após 24h de exposição, ambos os compostos mercuriais causaram uma inibição dose-dependente da atividade enzimática da TrxR. No entanto, o MeHg tratou-se de um inibidor mais potente do que o Hg^{2+} (70% e 50% de inibição a $5 \mu\text{M}$ de MeHg e de Hg^{2+} , respetivamente).
- Os compostos de selénio Na_2SeO_3 e SeMet exerceram um efeito protetor significativo quando co-expostos com os compostos mercuriais embora nem sempre tenham conseguido prevenir completamente a inibição da atividade enzimática da TrxR causada pelos últimos. Tanto o Na_2SeO_3 como a SeMet apresentaram um maior efeito protetor da atividade enzimática da TrxR quando em interação com o Hg^{2+} , o que confirma que a forma química de selénio e de mercúrio é de grande importância para o tipo de interação observado entre os dois elementos.

- Observou-se a existência de uma relação entre a inibição da atividade enzimática da TrxR nas células SH-SY5Y e a citotoxicidade exercida pelos compostos mercuriais pois, em ambos os casos, o MeHg revelou-se o inibidor mais potente.

De um modo geral, o trabalho desenvolvido nesta tese levantou algumas questões relacionadas com a toxicidade do mercúrio e dos compostos de selênio mas também ajudou a obter algumas respostas neste campo de pesquisa. Um dos pontos mais importantes estabelecidos tratou-se da clarificação dos efeitos benéficos originados pelo selênio na interação com o mercúrio em células neuroblastoma humanas. Apesar da controvérsia associada ao antagonismo da toxicidade do mercúrio por compostos de selênio continuar a existir, o presente trabalho aponta para a importância deste micronutriente a nível da síntese de selenoproteínas bem como na reativação de selenoenzimas inibidas.

2. Perspetivas futuras

Os vários estudos realizados nos últimos 60 anos sobre a toxicidade do mercúrio e do selénio permitiram que várias questões fossem esclarecidas relativamente ao já muito conhecido antagonismo entre estes dois elementos. Contudo, existem ainda algumas lacunas de importância crítica que necessitam de ser preenchidas antes de se considerar que este antagonismo se encontra plenamente compreendido do ponto de vista molecular.

Os resultados apresentados nesta dissertação levantaram questões interessantes relacionadas com o mecanismo de toxicidade do mercúrio e sobre a relação do último com o selénio. A clarificação destas perguntas irá permitir um melhor entendimento das interações moleculares do mercúrio, o papel do sistema da tioredoxina no desenvolvimento da sua toxicidade e se o selénio poderá ser usado enquanto agente terapêutico no sentido de contrariar a toxicidade causada por este elemento. Assim, a continuação do estudo teria em consideração:

- 1) Melhor caracterização da interação dos compostos mercuriais com o sistema da tioredoxina a um nível sub-celular, nomeadamente através da compreensão de possíveis diferenças que possam existir na maneira como o MeHg e o Hg^{2+} afetam o sistema da tioredoxina citosólico e mitocondrial nas células SH-SY5Y;
- 2) Realização da técnica western blot com a intenção de avaliar os efeitos causados na expressão da selenoenzima tioredoxina redutase pelos diferentes tratamentos com compostos de mercúrio e/ ou de selénio;
- 3) Os estudos de recuperação da atividade enzimática da tioredoxina redutase inibida por compostos mercuriais foram feitos com selenito de sódio e selenometionina na mesma concentração (2,5 μM). Seria relevante testar novas condições de co-exposição com outros compostos de selénio no sentido de se determinar se os resultados serão semelhantes. Seria também interessante alterar a ordem de adição dos compostos para determinar se tal teria impacto nos resultados;
- 4) São conhecidas várias alterações que podem ocorrer nos sistemas de libertação de neurotransmissores do sistema nervoso central que estão associadas à toxicidade dos metais pesados. Tanto o MeHg como o Hg^{2+} afetam o sinal excitatório mediado pelo

glutamato ao simultaneamente aumentar a sua libertação a partir do neurónio pré-sináptico e inibir a sua entrada para os astrócitos. Seria interessante verificar se a co-exposição destes tóxicos com compostos de selénio é ou não capaz de reverter os efeitos previamente mencionados;

5) A morte celular programada (apoptose) trata-se de um processo vital para a manutenção da integridade fisiológica dos organismos multicelulares. A Trx reduzida liga-se à ASK1, inibindo a sua atividade e promovendo a sua degradação. A inibição da TrxR por compostos mercuriais e consequente oxidação da Trx conduz à libertação da ASK1, o que culmina na ativação da apoptose. Seria relevante verificar se as condições de co-exposição testadas entre compostos de mercúrio e de selénio no presente trabalho permitem evitar ou diminuir a ativação da ASK-1;

6) Desenvolvimento de um estudo *in vivo* a ocorrer segundo condições de exposição repetida que permitiria esclarecer questões mecanísticas associadas a cenários fisiologicamente relevantes bem como perceber de que modo os estudos laboratoriais *in vitro* se relacionam efetivamente com a realidade dos sistemas biológicos mais complexos. A compreensão a nível molecular do antagonismo Hg-Se é um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias de tratamento que permitam regular os níveis destes dois elementos nos sistemas vivos.

Referências

- 1) Abramowitz, E. W. (1934) Historical points of interest on the mode of action and ill effects of mercury. *Bull NY Acad Med.* **10(12):695-705.**
- 2) Ahlmark, A. (1948) Poisoning by methyl mercury compounds. *Br J Ind Med.* **5(3):117-119.**
- 3) Al-Madani, W. A., Siddiqi, N. J. and Alhomida, A. S. (2009) Renal toxicity of mercuric chloride at different time intervals in rats. *Biochemistry Insights* **2:37-45.**
- 4) Anestål, K., Prast-Nielsen, S., Cenas, N. and Arnér, E. S. (2008) cell death by SecTRAPs: thioredoxin reductase as a prooxidant killer of cells. *PLoS One.* **3(4):1846.**
- 5) Arnér, E. S. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem.* **267(20):6102-6109.**
- 6) Arnér, E. S. and Holmgren, A. (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol.* **16(6):420-426.**
- 7) Arnér, E. S. J. (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases - important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta* **1790:495-526.**
- 8) Arnér, E. S. J. and Holmgren, A. (1999) Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. In *Current Protocols in Toxicology* (Maines, M. D., Costa, L. G., Reed, D. J., Sassa, S., and Sipes, I. G., eds) pp. 7.4.1-7.4.14, John Wiley & Sons, New York, USA.
- 9) ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica - Direcção de Avaliação e Comunicação dos Riscos) (2009) Perfil de risco dos principais alimentos consumidos em Portugal. [<http://www.fipa.pt/userfiles/file/i005411.pdf>].
- 10) Aschner, M., Mullaney, K. J., Fehm, M. N., Wagoner, D. E. and Vitarella, D. (1994) Astrocytes as potential modulators of mercuric chloride neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol.* **14(6):637-652.**
- 11) Atchison, W. D. and Hare, M. F. (1994) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB J.* **8(9):622-629.**
- 12) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Diseases Registry) (1999) Toxicological profile for mercury. [<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp46.pdf>].
- 13) Azevedo, B. F., Furieri, L. B., Peçanha, F. M., Wiggers, G. A., Vassallo, P. F., Simões, M. R., Fiorim, J., Batista, P. R., Fiorelli, M., Rossoni, L., Stefanon, I., Alonso, M. J., Salas, M. and

Vassallo, D. V. (2012) Toxic effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. *J Biomed Biotechnol.* **2012:949048**.

14) Barkay, T. and Wagner-Döbler, I. (2005) Microbial transformations of mercury: potentials, challenges, and achievements in controlling mercury toxicity in the environment. *Adv Appl Microbiol.* **57:1-52**.

15) Beckett, G. J. and Arthur, J. R. (2005) Selenium and endocrine systems. *J Endocrinol.* **184(3):455-465**.

16) Berglund, M., Lind, B., Björnberg, K. A., Palm, B., Einarsson, O. and Vahter, M. (2005) Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ Health.* **4:20**.

17) Berlin, M., Zalups, R. K. and Fowler, B. A. (2008) Mercury. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M. and Friberg, L. T., eds.) pp.675-729, Academic Press, USA.

18) Boffetta, P., Sällsten, G., Garcia-Gómez, M., Pompe-Kirn, V., Zaridze, D., Bulbulyan, M., Caballero, J. D., Ceccarelli, F., Kopal, A. B. and Merler, E. (2001) Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. *Occup Environ Med.* **58(7):461-466**.

19) Bose-O'Reilly, S., Lettmeier, B., Roider, G., Siebert, U. and Drasch, G. (2008) Mercury in breast milk - a health hazard for infants in gold mining areas?. *Int J Hyg Environ Health.* **211(5-6):615-623**.

20) Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72:248-254**.

21) Branco, V. (2012) Toxic pathway of mercurials in HepG2 cells with and without co-exposure to selenium: from the inhibition of the thioredoxin system to cell death. In *In Vivo Mercury Interaction with the Thioredoxin System, Chapter 5, PhD thesis, Faculty of Pharmacy, University of Lisbon, Lisbon*.

22) Branco, V., Canário, J., Lu, J., Holmgren, A. and Carvalho, C. (2012) Mercury and selenium interaction *in vivo*: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* **52(4):781-793**.

23) Buckell, M., Hunter, D., Milton, R. and Perry, K. M. A. (1946) Chronic mercury poisoning. *Br J Ind Med.* **3(2):55-63**.

- 24) Budtz-Jørgensen, E., Grandjean, P. and Weihe, P. (2007) Separation of risks and benefits of seafood intake. *Environ Health Perspect.* **115(3):323-327.**
- 25) Burk, R. F. and Hill, K. E. (2009) Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* **1790(11):1441-1447.**
- 26) Burke-Gaffney, A., Callister, M. E. and Nakamura, H. (2005) Thioredoxin: friend or foe in human disease?. *Trends Pharmacol Sci.* **26(8):398-404.**
- 27) Cabañero, A. I., Carvalho, C., Madrid, Y., Batoréu, C. and Cámara, C. (2005) Quantification and speciation of mercury and selenium in fish samples of high consumption in Spain and Portugal. *Biol Trace Elem Res.* **103(1):17-35.**
- 28) Caffrey, P. B. and Frenkel, G. D. (1992) Selenite cytotoxicity in drug resistant and nonresistant human ovarian tumor cells. *Cancer Res.* **52(17):4812-4816.**
- 29) Caravati, E. M., Erdman, A. R., Christianson, G., Nelson, L. S., Woolf, A. D., Booze, L. L., Cobaugh, D. J., Chyka, P. A., Scharman, E. J., Manoguerra, A. S., Troutman, W. G. and American Association of Poison Control Centers (2008) Elemental mercury exposure: an evidence-based consensus guideline for out-of-hospital management. *Clin Toxicol (Phila).* **46(1):1-21.**
- 30) Cárdenas, A., Roels, H., Bernard, A. M., Barbon, R., Buchet, J. P., Lauwerys, R. R., Roselló, J., Hotter, G., Mutti, A. and Franchini, I. (1993) Markers of early renal changes induced by industrial pollutants. Application to workers exposed to mercury vapour. *Br J Ind Med.* **50(1):17-27.**
- 31) Carratù, M. R., Borracci, P., Coluccia, A., Giustino, A., Renna, G., Tomasini, M. C., Raisi, E., Antonelli, T., Cuomo, V., Mazzoni, E. and Ferraro, L. (2006) Acute exposure to methylmercury at two developmental windows: focus on neurobehavioral and neurochemical effects in rat offspring. *Neuroscience.* **141(3):1619-1629.**
- 32) Cartwright, T. and Shah, G. P. (2002) Culture media. In *Basic Cell Culture*, (Davis, J. M. ed.) pp. 69-106, Oxford University Press Inc., New York, USA.
- 33) Carvalho, C. M., Chew, E. H., Hashemy, S. I., Lu, J. and Holmgren, A. (2008b) Inhibition of the human thioredoxin system. A molecular mechanism of mercury toxicity. *J Biol Chem.* **283(18):11913-11923.**

- 34) Carvalho, C. M., Lu, J., Zhang, X., Arnér, E. S. and Holmgren, A. (2011) Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J.* **25(1):370-381.**
- 35) Carvalho, C. M., Matos, A. I., Mateus, M. L., Santos, A. P. and Batoreu, M. C. (2008a) High-fish consumption and risk prevention: assessment of exposure to methylmercury in Portugal. *J Toxicol Environ Health A.* **71(18):1279-1288.**
- 36) CEC (Commission of the European Communities) (2006) Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. [<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF>].
- 37) Chan, H. M. and Egeland, G. M. (2004) Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases. *Nutr Rev.* **62(2):68-72.**
- 38) Chapman, L. and Chan, H. M. (2000) The influence of nutrition on methyl mercury intoxication. *Environ Health Perspect.* **108(1):29-56.**
- 39) Chen, T. and Wong, Y. S. (2008) Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. *Cell Mol Life Sci.* **65(17):2763-2775.**
- 40) Chen, Y., Yu, M., Jones, D. P., Greenamyre, J. T. and Cai, J. (2006) Protection against oxidant-induced apoptosis by mitochondrial thioredoxin in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* **216(2):256-262.**
- 41) Cheng, Q., Antholine, W. E., Myers, J. M., Kalyanaraman, B., Arnér, E. S. and Myers, C. R. (2010) The selenium-independent inherent pro-oxidant NADPH oxidase activity of mammalian thioredoxin reductase and its selenium-dependent direct peroxidase activities. *J Biol Chem.* **285(28):21708-21723.**
- 42) Chew, E. H., Lu, J., Bradshaw, T. D. and Holmgren, A. (2008) Thioredoxin reductase inhibition by antitumor quinols: a quinol pharmacophore effect correlating to antiproliferative activity. *FASEB J.* **22(6):2072-2083.**
- 43) Chisholme, C. (1813) Two examples of the beneficial effects of mercury in some severe affections of the brain, *Med Chir Trans.* **4:35-37.**

- 44) Choi, A. L., Budtz-Jørgensen, E., Jørgensen, P. J., Steuerwald, U., Debes, F., Weihe, P. and Grandjean, P. (2008) Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. *Environ Res.* **107(1):45-52**.
- 45) Choi, A. L., Weihe, P., Budtz-Jørgensen, E., Jørgensen, P. J., Salonen, J. T., Tuomainen, T. P., Murata, K., Nielsen, H. P., Petersen, M. S., Askham, J. and Grandjean, P. (2009) Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environ Health Perspect.* **117(3):367-372**.
- 46) Choi, S. C., Chase Jr., T. and Bartha, R. (1994) Enzymatic catalysis of mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS. *Appl Environ Microbiol.* **60(4):1342-1346**.
- 47) Clarke, C. (1912) Sterilization of the skin by spirituous solution of mercury perchloride. *Br. Med. J.* **2(2700):764-765**.
- 48) Clarkson, T. W. (1998) Human toxicology of mercury. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* **11(2-3):303-317**.
- 49) Clarkson, T. W. (2002) The three modern faces of mercury. *Environ Health Perspect.* **110(1):11-23**.
- 50) Clarkson, T. W. and Magos, L. (2006) The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit Rev Toxicol.* **36(8):609-662**.
- 51) Clarkson, T. W., Magos, L. and Myers, G. J. (2003a) Human exposure to mercury: the three modern dilemmas. *J Trace Elem Exp Med* **16:321-343**.
- 52) Clarkson, T. W., Magos, L. and Myers, G. J. (2003b) The toxicology of mercury - current exposures and clinical manifestations. *N Engl J Med.* **349(18):1731-1737**.
- 53) Clarkson, T. W., Vyas, J. B. and Ballatori, N. (2007) Mechanisms of mercury disposition in the body. *Am J Ind Med.* **50(10):757-764**.
- 54) Combs, G. F. and Gray, W. P. (1998) Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther.* **79(3):179-192**.
- 55) Corcoran, N. M., Martin, D., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Nguyen, T., Nheu, L., Sundstrom, L. E., Costello, A. J., Hovens, C. M. (2010) Sodium selenate specifically activates PP2A phosphatase, dephosphorylates tau and reverses memory deficits in an Alzheimer's disease model. *J Clin Neurosci.* **17(8):1025-1033**.

- 56) Cuvin-Aralar, M. L. and Furness, R. W. (1988) Uptake and elimination of inorganic mercury and selenium by minnows *Phoxinus phoxinus*. *Aquatic Toxicology*. **13(3):205-215**.
- 57) Cuvin-Aralar, M. L. and Furness, R. W. (1991) Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol Environ Saf.* **21(3):348-364**.
- 58) Davidson, P. W., Myers, G. J., Cox, C., Axtell, C., Shamlaye, C., Sloane-Reeves, J., Cernichiari, E., Needham, L., Choi, A., Wang, Y., Berlin, M. and Clarkson, T. W. (1998) Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *JAMA* **280(8):701-707**.
- 59) Deagen, J. T., Butler, J. A., Beilstein, M. A. and Whanger, P. D. (1987) Effects of dietary selenite, selenocystine and selenomethionine on selenocysteine lyase and glutathione peroxidase activities and on selenium levels in rat tissues. *J Nutr.* **117(1):91-98**.
- 60) Denizot, F. and Lang, R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods.* **89(2):271-277**.
- 61) DeRouen, T. A., Martin, M. D., Leroux, B. G., Townes, B. D., Woods, J. S., Leitão, J., Castro-Caldas, A., Luis, H., Bernardo, M., Rosenbaum, G. and Martins, I. P. (2006) Neurobehavioral effects of dental amalgam in children: a randomized clinical trial. *JAMA* **295(15):1784-1792**.
- 62) Dorea, J. G. (2003) Fish are central in the diet of Amazonian riparians: should we worry about their mercury concentrations?. *Environ Res.* **92(3):232-244**.
- 63) Dórea, J. G., Marques, R. C. and Isejima, C. (2012) Neurodevelopment of Amazonian infants: antenatal and postnatal exposure to methyl- and ethylmercury. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012:132876**.
- 64) Duchemin, M. B., Auffret, M., Wessel, N., Fortier, M., Morin, Y., Pellerin, J. and Fournier, M. (2008) Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through *in vivo*, *in tubo* and *in vitro* exposures. *Environmental Pollution* **153:416-423**.
- 65) Dunn, B. K., Richmond, E. S., Minasian, L. M., Ryan, A. M. and Ford, L. G. (2010) A nutrient approach to prostate cancer prevention: the selenium and vitamin E cancer prevention trial (SELECT). *Nutr Cancer.* **62(7):896-918**.

- 66) Dutczak, W. J. and Ballatori, N. (1994) Transport of the glutathione-methylmercury complex across liver canalicular membranes on reduced glutathione carriers. *J Biol Chem.* **269(13):9746-9751**.
- 67) Eisler, R. (2006) Properties. In *Mercury Hazards to Living Organisms (Eisler, R., ed.)* pp. 23-31, CRC Press - Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
- 68) Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K. and Kitamura, T. (2007) Minamata disease revisited: an update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *J Neurol Sci.* **262(1-2):131-144**.
- 69) Ellingsen, D. G., Barregård, L., Gaarder, P. I., Hultberg, B. and Kjuus, H. (1993b) Assessment of renal dysfunction in workers previously exposed to mercury vapour at a chloralkali plant. *Br J Ind Med.* **50(10):881-887**.
- 70) Ellingsen, D.G., Mørland, T., Andersen, A. and Kjuus, H. (1993a) Relation between exposure related indices and neurological and neurophysiological effects in workers previously exposed to mercury vapour. *Br J Ind Med.* **50(8):736-744**.
- 71) EPA (Environmental Protection Agency) (2001) Water quality criterion for the protection of human health: methylmercury. [http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/methylmercury/upload/2009_01_15_criteria_methylmercury_mercury-criterion.pdf].
- 72) Falnoga, I., Mrhar, A., Karba, R., Stegnar, P., Skreblin, M. and Tusek-Znidaric, M. (1994) Mercury toxicokinetics in Wistar rats exposed to elemental mercury vapour: modeling and computer simulation. *Arch Toxicol.* **68(7):406-415**.
- 73) Farina, M., Rocha, J. B. and Aschner, M. (2011) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci.* **89(15-16):555-563**.
- 74) Feng, X., Li, P., Qiu, G., Wang, S., Li, G., Shang, L., Meng, B., Jiang, H., Bai, W., Li, Z. and Fu, X. (2008) Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou province, China. *Environ Sci Technol.* **42(1):326-332**.
- 75) Fillion, M., Mergler, D., Sousa Passos, C. J., Larribe, F., Lemire, M. and Guimarães, J. R. (2006) A preliminary study of mercury exposure and blood pressure in the Brazilian Amazon. *Environ Health.* **5:29**.
- 76) Fitzgerald, W. F. and Lamborg, C. H. (2004) Geochemistry of mercury in the environment. In *Teatrise on Geochemistry (Lollar, B. S., ed.)* volume 9, Elsevier, Inc, New York, USA.

- 77) Flohé, L. and Brigelius-Flohe, R. (2006) Selenoproteins of the glutathione system. In *Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health* (Hatfield D. L, Berry, M. J. and Gladishev, V. N. eds.) pp. 161-172, Springer, New York, USA.
- 78) Fonfría, E., Vilaró, M. T., Babot, Z., Rodríguez-Farré, E. and Suñol, C. (2005) Mercury compounds disrupt neuronal glutamate transport in cultured mouse cerebellar granule cells. *J Neurosci Res.* **79(4):545-553**.
- 79) Franco, J. L., Posser, T., Dunkley, P. R., Dickson, P. W., Mattos, J. J., Martins, R., Bainy, A. C., Marques, M. R., Dafre, A. L. and Farina, M. (2009) Methylmercury neurotoxicity is associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free Radic Biol Med.* **47(4):449-457**.
- 80) Freshney, R. I. (2005a) Defined media and supplements. In *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*, pp. 115-128, John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- 81) Freshney, R. I. (2005b) Subculture and cell lines. In *Culture of Animal Cell: a Manual of Basic Technique*, pp. 199-216, John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- 82) Freshney, R. I. (2005c) Quantitation. In *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*, pp. 335-358, John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
- 83) Frisk, P., Yaqob, A., Nilsson, K., Carlsson, J. and Lindh, U. (2000) Differences in the growth inhibition of cultured K-562 cells by selenium, mercury or cadmium in two tissue culture media (RPMI-1640, Ham's F-10). *Biometals.* **13(2):101-111**.
- 84) Gage, J. C. (1961) The distribution and excretion of inhaled mercury vapour, *Br J Ind Med.* **18(4):287-294**.
- 85) Gailer, J., George, G. N., Pickering, I. J., Madden, S., Prince, R. C., Yu, E. Y., Denton, M. B., Younis, H. S. and Aposhian, H. V. (2000) Structural basis of the antagonism between inorganic mercury and selenium in mammals. *Chem Res Toxicol.* **13(11):1135-1142**.
- 86) Ganther, H. E., Goudie, C., Sunde, M. L., Kopecky, M. J. and Wagner, P. (1972) Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science.* **175(4026):1122-1124**.
- 87) Gardner, R. M., Nyland, J. F., Silva, I. A., Ventura, A. M., de Souza, J. M. and Silbergeld, E. K. (2010) Mercury exposure, serum antinuclear/antinucleolar antibodies, and serum cytokine levels in mining populations in Amazonian Brazil: a cross-sectional study. *Environ Res.* **110(4):345-354**.

- 88) Goel, A., Fuerst, F., Hotchkiss, E. and Boland, C. R. (2006) Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cancer Biol Ther.* **5(5):529-535**.
- 89) Gromer, S., Urig, S. and Becker, K. (2004) The thioredoxin system-from science to clinic. *Med Res Rev.* **24(1):40-89**.
- 90) Halbach, S. and Clarkson, T. W. (1978) Enzymatic oxidation of mercury vapour by erythrocytes. *Biochim Biophys Acta.* **523(2):522-531**.
- 91) Hansen, J. M., Go, Y. M. and Jones, D. P. (2006b) Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **46:215-234**.
- 92) Hansen, J. M., Zhang, H. and Jones, D. P. (2006a) Differential oxidation of thioredoxin-1, thioredoxin-2, and glutathione by metal ions. *Free Radic Biol Med.* **40(1):138-145**.
- 93) Hashemy, S. I. (2011) The human thioredoxin system: modifications and clinical applications. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* **14(3):191-204**.
- 94) Hatfield, D. L., Carlson, B. A., Xu, X., Mix, H. and Gladyshev, V. N. (2006) Selenocysteine incorporation machinery and the role of selenoproteins in development and health. *Prog Nucleic Acid Re* **81:97-142**.
- 95) Havarinasab, S. and Hultman, P. (2005) Organic mercury compounds and autoimmunity. *Autoimmun Rev.* **4(5):270-275**.
- 96) Heath, J. C., Abdelmageed, Y., Braden, T. D. and Goyal, H. O. (2012) The effects of chronic ingestion of mercuric chloride on fertility and testosterone levels in male Sprague Dawley rats. *J Biomed Biotechnol.* **2012:815186**.
- 97) Holmgren, A. (2006) Selenite in cancer therapy: a commentary on "Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress". *Free Radic Biol Med.* **41(6):862-865**.
- 98) Holmgren, A. and Lu, J. (2010) Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **396(1):120-124**.
- 99) Houston, M. C. (2011) Role of mercury toxicity in hypertension, cardiovascular disease, and stroke. *J Clin Hypertens* **13(8):621-627**.

- 100) Inoue, S., Yorifuji, T., Tsuda, T. and Doi, H. (2012) Short-term effect of severe exposure to methylmercury on atherosclerotic heart disease and hypertension mortality in Minamata. *Sci Total Environ.* **417-418**:291-293.
- 101) Karatela, S., Paterson, J., Schluter, P. J. and Anstiss, R. (2011) Methylmercury exposure through seafood diet and health in New Zealand: are seafood eating communities at a greater risk?. *Australasian Epidemiologist* **18(1)**:21-25.
- 102) Khan, M. A. and Wang, F. (2009) Mercury-selenium compounds and their toxicological significance: toward a molecular understanding of the mercury-selenium antagonism. *Environ Toxicol Chem.* **28(8)**:1567-15677.
- 103) Kim, Y. J., Chai, Y. G. and Ryu, J. C. (2005) Selenoprotein W as molecular target of methylmercury in human neuronal cells is down-regulated by GSH depletion. *Biochem Biophys Res Commun.* **330(4)**:1095-1102.
- 104) Kishi, R., Doi, R., Fukuchi, Y., Satoh, H., Satoh, T., Ono, A., Moriwaka, F., Tashiro, K., Takahata, N. and Sasatani, N. (1994) Residual neurobehavioural effects associated with chronic exposure to mercury vapour. *Occup Environ Med.* **51(1)**:35-41.
- 105) Kollock, C. W. (1896) Use of mercury in traumatic irido-choroiditis. *Trans Am Ophthalmol Soc.* **7**:602-606.
- 106) Kosta, L., Byrne, A. R. and Zelenko, V. (1975) Correlation between selenium and mercury in man following exposure to inorganic mercury. *Nature* **254**:238-239.
- 107) Kumar, S., Björnstedt, M. and Holmgren, A. (1992) Selenite is a substrate for calf thymus thioredoxin reductase and thioredoxin and elicits a large non-stoichiometric oxidation of NADPH in the presence of oxygen. *Eur J Biochem.* **207(2)**:435-439.
- 108) Lemaire, S., Keryer, E., Stein, M., Schepens, I., Issakidis-Bourguet, E., Grard-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M. and Jacquot, J. P. (1999) Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **120(3)**:773-778.
- 109) Lewandowski, T. A., Ponce, R. A., Charleston, J. S., Hong, S. and Faustman, E. M. (2003) Effect of methylmercury on midbrain cell proliferation during organogenesis: potential cross-species differences and implications for risk assessment. *Toxicol Sci.* **75(1)**:124-133.
- 110) Lillig, C. H. and Holmgren, A. (2007) Thioredoxin and related molecules - from biology to health and disease. *Antioxid Redox Signal.* **9(1)**:25-47.

- 111) Lu, J., Chew, E. H. and Holmgren, A. (2007) Targeting thioredoxin reductase is a basis for cancer therapy by arsenic trioxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104(30):12288-12293**.
- 112) Lu, J., Zhong, L., Lönn, M. E., Burk, R. F., Hill, K. E. and Holmgren, A. (2009) Penultimate selenocysteine residue replaced by cysteine in thioredoxin reductase from selenium-deficient rat liver. *FASEB J*. **23(8):2394-2402**.
- 113) Lunøe, K., Gabel-Jensen, C., Stürup, S., Andresen, L., Skov, S. and Gammelgaard, B. (2011) Investigation of the selenium metabolism in cancer cell lines. *Metallomics*. **3(2):162-168**.
- 114) MacFarquhar, J. K., Broussard, D. L., Melstrom, P., Hutchinson, R., Wolkin, A., Martin, C., Burk, R. F., Dunn, J. R., Green, A. L., Hammond, R., Schaffner, W. and Jones, T. F. (2010) Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med*. **170(3):256-261**.
- 115) Magos, L. (1997) Physiology and toxicology of mercury. In *Metal Ions in Biological Systems, Volume 34: Mercury and its Effects on Environment and Biology* (Sigel, A. and Sigel, H. eds.), pp. 321-370, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- 116) Magos, L. and Webb, M. (1977) The effect of selenium on the brain uptake of methylmercury. *Arch Toxicol*. **38(3):201-207**.
- 117) Mahaffey, K. R., Sunderland, E. M., Chan, H. M., Choi, A. L., Grandjean, P., Mariën, K., Oken, E., Sakamoto, M., Schoeny, R., Weihe, P., Yan, C. H. and Yasutake, A. (2011) Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev*. **69(9):493-508**.
- 118) MDCH/ ATSDR (Michigan Department of Community Health/ Agency for Toxic Substances and Diseases Registry) (2009) Health consultation - technical support document for a methylmercury reference dose as a basis for fish consumption screening values (FCSVs). [<http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/pha/MethylmercuryReference/TechnicalSupportDocumentforAMethylmercuryReferenceDoseasaBasisforFCSVs9-10-2009.pdf>]
- 119) Meyers, C. R. (2012) The effects of chromium(VI) on the thioredoxin system: implications for redox regulation. *Free Radic Biol Med*. **52(10):2091-2107**.
- 120) Miklavčič, A., Casetta, A., Tratnik J. S., Mazej, D., Krsnik, M., Mariuz, M., Sofianou, K., Spirić, Z., Barbone, F. and Horvat, M. (2013) Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res*. **120:7-17**.

- 121) Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A. E., Pedrajas, J. R., Gustafsson, J-A. and Spyrou, G. (1999) Human mitochondrial thioredoxin reductase cDNA cloning, expression and genomic organization. *Eur J Biochem.* **261(2):405-412.**
- 122) Morel, F. M. M., Kraepiel, A. M. L. and Amyot, M. (1998) The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annu Rev Ecol Syst* **29:543-566.**
- 123) Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* **65(1-2):55-63.**
- 124) Mottet, N. K., Vahter, M. E., Charleston, J. S. and Friberg, L. T. (1997) Metabolism of methylmercury in the brain and its toxicological significance. In *Metal Ions in Biological Systems, Volume 34: Mercury and its Effects on Environment and Biology* (Sigel, A. and Sigel, H. eds.) pp. 371-403, Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- 125) Mukherjee, A. and Martin, S. G. (2008) The thioredoxin system: a key target in tumour and endothelial cells. *Br J Radiol.* **81(1):57-68.**
- 126) Nagamuna, A., Ishii, Y. and Imura, N. (1984) Effect of administration sequence of mercury chloride and sodium selenite on their fates and toxicities in mice. *Ecotoxicol Environ Saf.* **8(6):572-580.**
- 127) Neal, P. A. (1938) Mercury poisoning from the public health viewpoint. *Am J Public Health* **28(8):907-915.**
- 128) Nilsson, G., Sun, X., Nyström, C., Rundlöf, A. K., Potamitou Fernandes, A., Björnstedt, M. and Dobra, K. (2006) Selenite induces apoptosis in sarcomatoid malignant mesothelioma cells through oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* **41(6):874-885.**
- 129) Nordberg, J. and Arnér, E. S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* **31(11):1287-1312.**
- 130) NRC (National Research Council) (2000) Toxicological effects of methylmercury. [<http://www.nap.edu/openbook.php?isbn=0309071402>].
- 131) Nyland, J. F., Fillion, M., Barbosa, F., Shirley, D. L., Chine, C., Lemire, M., Mergler, D. and Silbergeld E. K. (2011) Biomarkers of methylmercury exposure immunotoxicity among fish consumers in Amazonian Brazil. *Environ Health Perspect.* **119(12):1733-1738.**
- 132) OEHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment) (2001) Determination of noncancer chronic reference exposure levels: chronic toxicity summary - selenium and selenium compounds. [http://oehha.ca.gov/air/chronic_rels/pdf/selenium.pdf].

- 133) Ohno, T., Sakamoto, M., Kurosawa, T., Dakeishi, M., Iwata, T. and Murata, K. (2007) Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environ Res.* **103(2):191-197.**
- 134) Oken, E. and Bellinger, D. C. (2008) Fish consumption, methylmercury and child neurodevelopment. *Curr Opin Pediatr.* **20(2):178-183.**
- 135) Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. and Khanna, K. K. (2007) From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* **9(7):775-806.**
- 136) Parizek, J. and Ostadalova, I. (1967) Protective effect of small amounts of selenite in sublimate intoxication. *Experientia* **23(2):142-143.**
- 137) Parizek, J., Ostadalova, I., Kalouskva, J., Babichy, A. and Benes, J. (1971) The detoxifying effects of selenium. Interrelation between compounds of selenium and certain metals. In *Newer Trace Elements in Nutrition (Mertz, W. and Cornatzer, W. E. eds.) pp. 85-122, Marcel Dekker Inc, New York, USA.*
- 138) Parran, D. K., Mundy, W. R. and Barone Jr., S. (2001) Effects of methylmercury and mercuric chloride on differentiation and cell viability in PC12 cells. *Toxicol Sci.* **59(2):278-290.**
- 139) Philchenkov, A., Zavelevich, M., Khranovskaya, N. and Surai, P. (2007) Comparative analysis of apoptosis induction by selenium compounds in human lymphoblastic leukemia MT-4 cells. *Exp Oncol.* **29(4):257-261.**
- 140) Pingree, S. D., Simmonds, P. L., Rummel, K. T. and Woods, J. S. (2001) Quantitative evaluation of urinary porphyrins as a measure of kidney mercury content and mercury body burden during prolonged methylmercury exposure in rats. *Toxicol Sci.* **61(2):234-240.**
- 141) Pirrone, N., Cinnirella, S., Feng, X., Finkelman, R. B., Friedli, H. R., Leaner, J., Mason, R., Mukherjee, A. B., Stracher, G., Streets, D. G. and Telmer, K. (2010) Global mercury emissions to the atmosphere from natural and anthropogenic sources. *Atmos. Chem. Phys.* **10:5951-5964.**
- 142) Rahmanto, A. S. and Davies, M. J. (2012) Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants. *IUBMB Life.* **64(11):863-871.**
- 143) Ralston, N. V. and Raymond, L. J. (2010) Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology.* **278(1):112-123.**
- 144) Ralston, N. V., Ralston, C. R., Blackwell, J. L. and Raymond, L. J. (2008) Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology.* **29(5):802-811.**

- 145) Rayman, M. P. (2000) The importance of selenium to human health. *Lancet*. **356(9225):233-241**.
- 146) Reid, M. E., Stratton, M. S., Lillico, A. J., Fakih, M., Natarajan, R., Clark, L. C., Marshall, J. R. (2004) A report of high-dose selenium supplementation: response and toxicities. *J Trace Elem Med Biol*. **18(1):69-74**.
- 147) Richardson, G. M., Wilson, R., Allard, D., Purtill, C., Douma, S. and Gravière, J. (2011) Mercury exposure and risks from dental amalgam in the US population, post-2000. *Sci Total Environ*. **409(20):4257-4268**.
- 148) Rooney, J. P. (2007) The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*. **234(3):145-156**.
- 149) Roos, D. H., Puntel, R. L., Lugokenski, T. H., Ineu, R. P., Bohrer, D., Burger, M. E., Franco, J. L., Farina, M., Aschner, M., Rocha, J. B. and de Vargas Barbosa, N. B. (2010) Complex methylmercury-cysteine alters mercury accumulation in different tissues of mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. **107(4):789-792**.
- 150) Rustam, H. and Hamdi, T. (1974) Methyl mercury poisoning in Iraq. A neurological study. *Brain*. **97(3):500-510**.
- 151) Saint-Amour, D., Roy, M. S., Bastien, C., Ayotte, P., Dewailly, E., Després, C., Gingras, S. and Muckle, G. (2006) Alterations of visual evoked potentials in preschool Inuit children exposed to methylmercury and polychlorinated biphenyls from a marine diet. *Neurotoxicology*. **27(4):567-578**.
- 152) Sanfeliu, C., Sebastià, J. and Ki, S. U. (2001) Methylmercury neurotoxicity in cultures of human neurons, astrocytes, neuroblastoma cells. *Neurotoxicology*. **22(3):317-327**.
- 153) Sasakura, C. and Suzuki, K. T. (1998) Biological interaction between transition metals (Ag, Cd and Hg), selenide/sulfide and selenoprotein P. *J Inorg Biochem*. **71(3-4):159-162**.
- 154) Satoh, H. (2000) Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. *Ind Health*. **38(2):153-164**.
- 155) Schantz, J. T. and Ng, K. W. (2010) E.3. Quantitative cell proliferation assays. In *A Manual for Primary Human Cell Culture*. (Schantz, J. T. ed.) pp.140-146 , World Scientific, New Jersey, USA.

- 156) SCOEL (Scientific Committee on Occupational Exposure Limits) (2007) Recommendation from the scientific committee on occupational exposure limits for elemental mercury and inorganic divalent mercury compounds. [<http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=3852&langId=en>].
- 157) Selin, N. E. (2009) Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **34**:43-63.
- 158) Smeets, A., Evrard, C., Landtmeters, M., Marchand, C., Knoop, B. and Declercq, J. P. (2005) Crystal structures of oxidized and reduced forms of human mitochondrial thioredoxin 2. *Protein Sci.* **14**(10):2610-2621.
- 159) Stern, A. H. (2005) A review of the studies of the cardiovascular health effects of methylmercury with consideration of their suitability for risk assessment. *Environ Res.* **98**(1):133-142.
- 160) Su, D., Novoselov, S. V., Sun, Q. A., Moustafa, M. E., Zhou, Y., Oko, R., Hatfield, D. L. and Gladyshev, V. N. (2005) Mammalian selenoprotein thioredoxin-glutathione reductase. Roles in disulfide bond formation and sperm maturation. *J Biol Chem* **280**:26491-26498.
- 161) Suzuki, K. T. and Ogra, Y. (2001) Metabolism of selenium and its interaction with mercury: mechanisms by a speciation study. *Phosphorus Sulfur* **171**(1):135-169.
- 162) Suzuki, K. T., Sasakura, C. and Yoneda, S. (1998) Binding sites for the (Hg-Se) complex on selenoprotein P. *Biochim Biophys Acta.* **1429**(1):102-112.
- 163) Talbot, S., Nelson, R. and Self, W. T. (2008) Arsenic trioxide and auranofin inhibit selenoprotein synthesis: implications for chemotherapy for acute promyelocytic leukaemia. *Br J Pharmacol.* **154**(5):940-948.
- 164) Tamm, C., Duckworth, J., Hermanson, O. and Ceccatelli, S. (2006) High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J Neurochem.* **97**(1):69-78.
- 165) Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N. and Sutton, D. (2003) Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ Toxicol.* **18**(3):149-175.
- 166) Tinggi, U. (2003) Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicol Lett.* **137**(1-2):103-110.

- 167) Toimela, T. and Tähti, H. (2004) Mitochondrial viability and apoptosis induced by aluminum, mercuric mercury and methylmercury in cell lines of neural origin. *Arch Toxicol.* **78(10):565-574.**
- 168) Tonk, E. C., de Groot, D. M., Penninks, A. H., Waalkens-Berendsen, I. D., Wolterbeek, A. P, Slob, W., Piersma, A. H. and van Loveren, H. (2010) Developmental immunotoxicity of methylmercury: the relative sensitivity of developmental and immune parameters. *Toxicol Sci.* **117(2):325-335.**
- 169) Valdiglesias, V., Pásaro, E., Méndez, J. and Laffon, B. (2010) *In vitro* evaluation of selenium genotoxic, cytotoxic, and protective effects: a review. *Arch Toxicol.* **84(5):337-351.**
- 170) Van Eersel, J., Ke, Y. D., Liu, X., Delerue, F., Kril, J. J., Götz, J. and Ittner, L. M. (2010) Sodium selenate mitigates tau pathology, neurodegeneration, and functional deficits in Alzheimer's disease models. *Proc Natl Acad Sci USA.* **107(31):13888-13893.**
- 171) Vas, J. and Monestier, M. (2008) Immunology of mercury. *Ann N Y Acad Sci.* **1143:240-267.**
- 172) Venardos, K., Harrison, G., Headrick, J. and Perkins, A. (2004) Effects of dietary selenium on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activity and recovery from cardiac ischemia-reperfusion. *J Trace Elem Med Biol.* **18(1):81-88.**
- 173) Wagner, C., Sudati, J. H., Nogueira, C. W. and Rocha, J. B. (2010) *In vivo* and *in vitro* inhibition of mice thioredoxin reductase by methylmercury. *Biometals.* **23(6):1171-1177.**
- 174) Watanabe, C. (2002) Modification of mercury toxicity by selenium: practical importance?. *Tohoku J Exp Med.* **196(2):71-77.**
- 175) Watson, W. H., Yang, X., Choi, Y. E., Jones, D. P. and Kehrer, J. P. (2004) Thioredoxin and its role in toxicology. *Toxicol Sci.* **78(1):3-14.**
- 176) Wheeler, M. C. (1947) Discoloration of the eyelids from prolonged use of ointments containing mercury. *Trans Am Ophthalmol Soc.* **45:74-80.**
- 177) WHO (World Health Organization) (2003) Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. [<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>].
- 178) WHO (World Health Organization) (2006) Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. [<http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/reports/trs940.pdf>].

- 179) WHO/ JECFA (World Health Organization/ JECFA) (2003) Summary and conclusions of the sixty-first meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA). [<ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf>].
- 180) Wu, Q., Huang, K. and Xu, H. (2003) Effects of long-term selenium deficiency on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase activities and expressions in rat aorta. *J Inorg Biochem.* **94(4):301-306**.
- 181) Yang, D. Y., Chen, Y. W., Gunn, J. M. and Belzile, N. (2008) Selenium and mercury in organisms: interactions and mechanisms. *Environmental Reviews* **16(1):71-92**.
- 182) Yasutake, A., Hirayama, K. and Inoue, M. (1989) Mechanism of urinary excretion of methylmercury in mice. *Arch Toxicol.* **63(6):479-483**.
- 183) Yoneda, S. and Suzuki, K. T. (1997) Detoxification of mercury by selenium by binding of equimolar Hg-Se complex to a specific plasma protein. *Toxicol Appl Pharmacol.* **143(2):274-280**.
- 184) Yorifuji, T., Tsuda, T., Kashima, S., Takao, S. and Harada, M. (2010) Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. *Environ Res.* **110(1):40-46**.
- 185) Yu, S. Y., Zhu, Y. J. and Li, W. G. (1997) Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong. *Biol Trace Elem Res.* **56(1):117-124**.
- 186) Zar, J. (1996) Two sample hypotheses. In *Biostatistical Analysis*, pp. 123-141, Prentice Hall International Editions, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- 187) Zhang, J., Svehlíková, V., Bao, Y., Howie, A. F., Beckett, G. J. and Williamson, G. (2003) Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis.* **24(3):497-503**.
- 188) Zhong, L., Arnér, E. S. J. and Holmgren, A. (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97(11):5854-5859**.
- 189) Zhong, L., Arnér, E. S., Ljung, J., Aslund, F. and Holmgren, A. (1998) Rat and calf thioredoxin reductase are homologous to glutathione reductase with a carboxyl-terminal elongation containing a conserved catalytically active penultimate selenocysteine residue. *J Biol Chem.* **273(15):8581-8591**.